ENTWICKLUNG EINER DREI-KOMPONENTEN-STOPPED FLOW-APPARATUR UND KINETISCHE STUDIEN ZUR KOMPLEXBILDUNG DES MEMBRANCARRIERS CALCIMYCIN MIT MG^{++} UND CA^{++}

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
vorgelegt beim Fachbereich Physik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

von
GÜNTHER KRAUSE
aus Leipzig

Frankfurt am Main, 1984

UNIV.
LEIDEN
ZOOL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523716_0045

Entwicklung einer Drei-Komponenten-Stopped flow-Apparatur und kinetische Studien zur Komplexbildung des Membrancarriers Calcimycin mit Mg^{++} und Ca^{++}

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
vorgelegt beim Fachbereich Physik
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
zu Frankfurt am Main

von

Günther Krause
aus Leipzig

Frankfurt am Main, 1984

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Physik
der J.W. Goethe-Universität in Frankfurt am Main

Dekan:	Prof. Dr. F. Granzer
Erster Berichterstatter:	Prof. Dr. R. Schlögl
Zweiter Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Pohlit
Tag der Promotion:	31. Januar 1984

Herrn Prof. Dr. R. Schlögl danke ich für die Möglichkeit, am Max Planck-Institut für Biophysik die vorliegende Dissertationsarbeit erstellt haben zu können sowie für die Betreuung dieser Arbeit.

Insbesondere danke ich Herrn Dr. Grell für die Themenstellung, die Betreuung sowie für die ständige Bereitschaft zu vielen anregenden Diskussionen. Herrn Dr. Ruf möchte ich ebenfalls für die aktive Teilnahme an diesen Diskussionen und die Formulierung die Arbeit betreffender Fragen danken.

Außerdem gilt mein Dank Herrn Dipl.-Ing. R. Bergbauer, dessen stetige Hilfsbereitschaft bei der Lösung von Fragestellungen, die den Aufbau elektronischer Schaltungen betrafen, eine wirksame Unterstützung für den Aufbau der Drei-Komponenten-Stopped flow-Apparatur war.

Besonders möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Werkstatt des Instituts bedanken. Gerade ihre exakte Arbeitsweise war eine wichtige Grundlage für den Aufbau der Drei-Komponenten-Stopped flow-Apparatur. An dieser Stelle gilt mein Dank besonders Herrn Nachtwey, der einen großen Anteil an dieser Arbeit hat.

Für das Anfertigen der Photographien aller in dieser Arbeit dargestellten Zeichnungen bedanke ich mich bei Frau B. Lehmann. Allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dr. Grell und des Instituts, die Anteil an der Verwirklichung dieser Arbeit haben gilt ebenfalls mein Dank.

FÜR RAMONA

UND MEINE ELTERN

Inhaltsverzeichnis

Seite

1. Einleitung.....1
1.1. Strömungsmethoden zur Untersuchung schneller Reaktionen in Lösung.....1
1.2. Aufgabenstellung.....8

2. Theoretische Grundlagen.....12
2.1. Ausgewählte hydrodynamische Prinzipien.....12
2.2. Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für reversible Reaktionen erster und zweiter Ordnung.....15

3. Die Drei-Komponenten-Stopped flow-Apparatur..20
3.1. Arbeitsweise und Gesamtaufbau der Apparatur..20
3.2. Mechanischer Aufbau.....23
3.2.1. Die Einzelkomponenten des mechanischen Kanülensystems.....26
3.2.1.1. Die Reservoirs.....26
3.2.1.2. Das Ventilsystem.....27
3.2.1.3. Die Mischkammer(MK).....32
3.2.1.4. Die Beobachtungskammer(BK).....33
3.2.2. Hydrodynamische Eigenschaften und die Bestimmung der Totzeiten der Apparatur.....34
3.2.2.1. Charakterisierung der Mischkammer.....34
3.2.2.2. Eigenschaften der Beobachtungskammer.....36
3.2.2.3. Charakterisierung verschiedener Einzelteile der Apparatur.....37
3.2.2.4. Strömungstechnische Charakterisierung der gesamten Apparatur.....39
3.2.2.5. Die Bestimmung der Totzeiten.....40

3.2.2.6. Die Bestimmung der Alterungszeiten.....45
3.3. Optik.....48
3.3.1. Die Lampen.....48
3.3.2. Die Monochromatoren.....49
3.3.3. Das Linsensystem.....49
3.3.4. Die Photomultiplier.....50
3.3.5. Spektrale Eigenschaften der Apparatur.....50
3.3.5.1. Absorptionsmessung.....50
3.3.5.2. Fluoreszenzmessung.....53
3.4. Elektronische Steuerungen, Messwerterfassung und Datenübertragung.....54
3.4.1. Die Steuerungsschaltung der Ventile.....54
3.4.2. Die Verstärkung der Meß- und Referenzsignale.59
3.4.3. Die Datenregistrierung, -übertragung und -auswertung.....61
3.5 Diskussion wichtiger Eigenschaften der Drei-Komponenten-Stopped flow-Apparatur.....63

4. Untersuchung der Protolyse und der Komplexbildungseigenschaften von Calcimycin.....67
4.1. Calcimycin - ein Kationen-Carrier in künstlichen und biologischen Membranen.....67
4.2. Physikalisch-chemische Eigenschaften des Calcimycins.....69
4.3. Problemstellung und Darstellung der Vorgehensweise.....73

5. Material und Methoden.....75
5.1. Chemikalien und Materialien.....75
5.2. Methoden.....77
5.2.1. Spektralphotometrische Titrationen.....77
5.2.1.1. Titration mit Absorptionsdetekion und Auswertung 77

5.2.1.2. Titration mit Fluoreszenzdetektion und Auswertung.....81
5.2.2. Stopped flow-Apparatur und Auswertung der Meßkurven.....82
5.2.3. Temperatur-Sprung-Apparatur und Auswertung...85

6. Komplexbildung von Calcimycin mit Magnesium- und Calciumionen.....89
6.1 Spektroskopische Eigenschaften und Gleichgewichtsuntersuchungen.....89
6.1.1. pH-Titrationen.....89
6.1.2. Untersuchung der Bindung von Magnesium- und Calciumionen an Calcimycin - Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten.....94
6.1.3. Interpretation der pH-Abhängigkeit der Komplexbildung von Calcimycin mit Magnesium- und Calciumionen.....100

6.2. Kinetische Untersuchungen.....103
6.2.1. Stopped flow-Experimente.....103
6.2.2. Temperatur-Sprung-Experimente.....108

7. Diskussion der Ergebnisse der Gleichgewichtsuntersuchungen und der kinetischen Messungen.....113

8. Zusammenfassung.....120

9. Literaturverzeichnis.....123

10. Anhang.....129

1. Einleitung

1.1. Strömungsmethoden zur Untersuchung schneller Reaktionen in Lösung

Eine experimentelle Methode zur Aufklärung des zeitlichen Verhaltens schneller chemischer und biochemischer Reaktionen ist die Strömungsmethode. Dieser Methode liegt das folgende Grundprinzip, das in Abb.1 verdeutlicht wird, zugrunde:

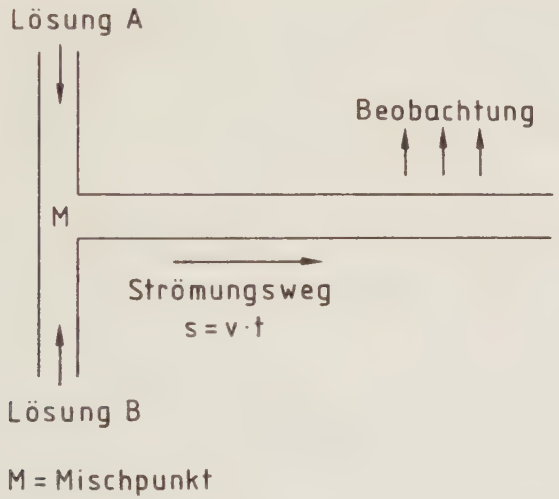


Abb.1: Das Prinzip der kontinuierlichen Strömungsmethode

Zwei Ausgangslösungen, die die Stoffe A und B enthalten, werden mit konstantem Druck in eine spezielle Kammer gedrückt und dort schnell gemischt. Das entstehende Reaktionsgemisch fließt anschließend in ein Beobachtungsrohr. Am Beobachtungsrohr wird die zeitliche Änderung der Konzentration einer der Stoffe während der Reaktion detektiert. Zur Beobachtung wird eine meßbare physikalische Eigenschaft des Reaktionsgemisches gewählt. Eine häufig verwendete Methode ist die Beobachtung der Absorptionseigenschaften des Reaktionsgemisches bei einer Wellenlänge mit einer photometrischen Detektionseinheit. Voraussetzung hierfür ist, daß eine Absorptionsdifferenz zwischen der Ausgangslösung und dem Reaktionsprodukt gemessen werden kann. Da die Reaktion hinter dem Mischpunkt fortschreitet, ergibt sich für die Absorption des Reaktionsgemisches bei konstanter Strömungsgeschwindigkeit an verschiedenen Positionen entlang des Beobachtungsrohres ein unterschiedliches Verhalten. Der Abstand vom Mischpunkt ist dann proportional zur Reaktionszeit. Man erhält so durch Aufzeichnung der Absorption an verschiedenen Positionen hinter dem Mischpunkt das zeitliche Verhalten der Reaktion. Mit dieser Methode ist es bei Anwendung hoher Drücke möglich, Reaktionen bis in dem Zeitbereich von Millisekunden zu verfolgen.

Schon 1923 konstruierten Hartridge und Roughton /1/ nach diesem Prinzip arbeitende Apparaturen. Sie drückten mittels Gasdruck die Lösungen durch eine Mischkammer in ein Beobachtungsrohr mit einer Länge von 30 cm. Der Durchmesser der Beobachtungsrohres betrug 6.28 mm. Die Mischkammer einer der beschriebenen Apparaturen hatte sechs Zuleitungen. Der Ausgang der Mischkammer hatte einen Durchmesser von 2.6 mm. Entsprechend diesen Bedingungen betrug die Strömungsgeschwindigkeit im Beobachtungsrohr 4m/s.

Entlang des Beobachtungsrohres konnten verschiedene relevante physikalische Eigenschaften des Reaktionsgemisches, wie Absorption, Brechungsindex oder Temperatur registriert werden. Hartridge und Roughton konnten mit dieser Apparatur noch Reaktionen mit einer Halbwertszeit von 3 ms beobachten.

Sie untersuchten die Reaktion einer Hämoglobinlösung mit einer Kohlenstoffmonoxidlösung /2/. Das Reaktionsgemisch wurde an verschiedenen Positionen des Beobachtungsrohres optisch beobachtet. Sie erhielten eine Reaktionskurve, die die Abhängigkeit der Änderung der Absorption des Reaktionsgemisches von der Zeit beschreibt. Hartridge und Roughton konnten mit diesen Messungen die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion ermitteln. Der Nachteil der von ihnen benutzten Apparaturen lag im großen Lösungsverbrauch (7.5 l pro Messung).Die von Hartridge und Roughton eingeführte Methode nennt man die kontinuierliche Strömungsmethode (continuous flow method).

1936 verbesserten Roughton und Millikan die kontinuierliche Strömungsmethode. Sie führten die gleichzeitige photoelektrische Messung der Absorption des Reaktionsgemisches an verschiedenen Positionen des Beobachtungsrohres ein. Außerdem konnten jetzt mit einem Beobachtungsrohr, das einen Durchmesser von 1 mm hatte, Reaktionen mit einer Halbwertszeit von 0.5 ms detektiert werden. Der Lösungsverbrauch verringerte sich mit dieser Apparatur auf 20 - 30 ml pro Messung /3/.

Gerischer und Heim /4/ entwickelten 1965 die kontinuierliche Strömungsmethode mit integrierender Anzeige zur Untersuchung schneller Reaktionen. Der Unterschied zur Strömungsmethode von Hartridge und Roughton besteht in der Anordnung zur Beobachtung des Reaktionsgemisches. Sie beo-

bachteten das Reaktionsgemisch entlang der Strömung durch das Strömungsrohr. Um die kinetischen Parameter einer Reaktion zu ermitteln, wird die Abhängigkeit der Gesamtextinktion von der Strömungsgeschwindigkeit betrachtet. Die Untersuchung einer Reaktion bei verschiedenen Strömungsgeschwindigkeiten ergibt die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion. Die Mischzeiten dieser Apparatur lagen unterhalb 1 ms. Der Lösungsverbrauch betrug 500 ml pro Messung /5/.

Gerischer und Heim /6/ verbesserten diese Methode, indem sie Mischung von beiden Edukten in ihre mathematischen Analysen einbezogen. Bei Kenntnis des zeitlichen Verlaufs des Mischvorgangs konnten sie den gesamten Reaktionsvorgang, der sich aus dem Mischvorgang und der chemischen Reaktion zusammensetzt, mit dieser Apparatur analysieren. Die Strömungsgeschwindigkeit im Beobachtungsrohr betrug 10 m/s. Bei dieser Geschwindigkeit gelang es Reaktionen mit Halbwertszeiten zwischen 1 ms und 0.2 ms ohne Berücksichtigung des Mischvorganges zu beobachten. Bei Einbeziehung des Mischvorganges wurde die Untersuchung für Reaktionen mit einer Halbwertszeit bis zu 0.01 ms für möglich gehalten.

Gerischer,Holzwarth und Mitarbeiter /7/8/ haben diese Strömungsmethode nochmals weiterentwickelt, so daß sie Geschwindigkeitskonstanten in der Größenordnung von $10^9 M^{-1} s^{-1}$ bestimmen konnten. Sie beobachteten Reaktionen mit Halbwertszeiten von 0.02 ms. Die Strömungsgeschwindigkeiten lagen bei ihren Messungen zwischen 1.7 und 5.9 m/s. Das Beobachtungsrohr hatte eine Länge von 20 mm und einen Durchmesser von 2 mm. Der Lösungsverbrauch betrug hier ebenfalls 500 ml /5/.

1940 entwickelte Chance /10/ die Stopped flow-Methode, die in Abb.2 schematisch dargestellt wird. Bei dieser

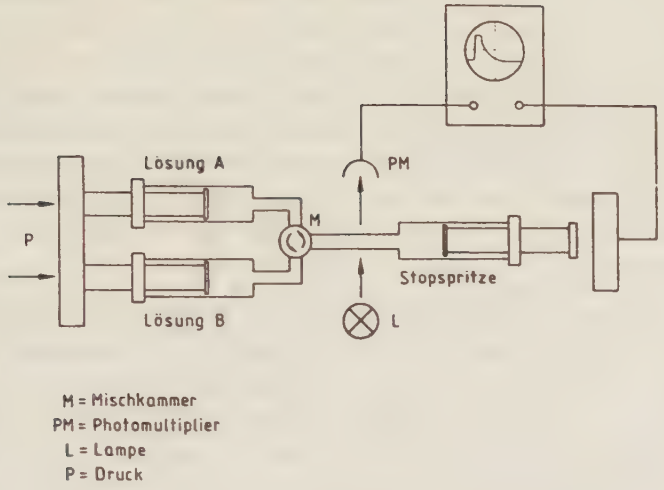


Abb.2: Das Prinzip der Stopped flow-Methode

Methode wird im Gegensatz zur kontinuierlichen Strömungsmethode der Fluß des Reaktionsgemisches hinter einer speziellen Beobachtungskammer gestoppt und das zeitliche Verhalten der Reaktion an einer fixen Position hinter der Mischkammer registriert. Realisiert wurde diese Methode wie folgt:

Die Ausgangslösungen wurden in zwei 1 ml-Spritzen gefüllt. Die Spritzenstempel wurden mit Hilfe eines pneumatischen Antriebs nach vorn gedrückt, so daß die Lösungen in eine Mischkammer und das Reaktionsgemisch in eine Beobachtungskammer gelangten. Die Strömungsgeschwindigkeit in der Beobachtungskammer betrug etwa 10 m/s /5/. Der Fluß des Reaktionsgemisches wurde mit einer dritten Spritze, die Chance hinter der Beobachtungskammer anordnete, gestoppt.

Danach konnte die zeitliche Änderung einer Konzentration der Ausgangsstoffe mit einem geeignetem Detektionssystem während der Reaktion an einer Position hinter der Mischkammer verfolgt werden. Es konnte so z.B. die zeitliche Änderung der Transmission eines Reaktionsgemisches mit einer photometrischen Einheit gemessen werden. Die kleinste gemessene Halbwertszeit einer Reaktion mit dieser Apparatur betrug 0.5 ms. Bei der von Chance entwickelten Methode verringerte sich der Lösungsverbrauch auf weniger als 1 ml pro Messung.

Eine neuere Entwicklung ist die Stopped flow-Apparatur der japanischen Firma Union Giken /11/. Die Lösungen werden anstatt mit Spritzenstempeln mit Gasdruck durch die Mischkammer in die Beobachtungskammer vorgetrieben (siehe Abb.3). Der Fluß des Reaktionsgemisches wird mit einem hinter der Beobachtungskammer befindlichen Ventil abgestoppt. Die Totzeit* dieser Apparatur beträgt bei einer optischen Weglänge von 2 mm nur 0.5 ms.

1980 veröffentlichten Owens und Margerum eine Arbeit /5/, in der sie die Konstruktion und Arbeitsweise einer Apparatur beschrieben, die nach der Pulsed flow-Methode arbeitet. Der Aufbau der Apparatur basiert auf dem einer Stopped flow-Apparatur. Der Unterschied zur Stopped flow-Apparatur besteht in der Anordnung zur Beobachtung des Reaktionsgemisches. Die Beobachtung erfolgt entlang der Strömungsrichtung, so daß der Mischvorgang mit in die mathematische Analyse der Reaktion eingeht (integrierende

---

*Die Totzeit ist die Zeit, die das Reaktionsgemisch braucht, um von der Mischkammer zur Beobachtungskammer zu gelangen. Das Reaktionsgemisch kann während dieser Zeit nicht beobachtet werden.

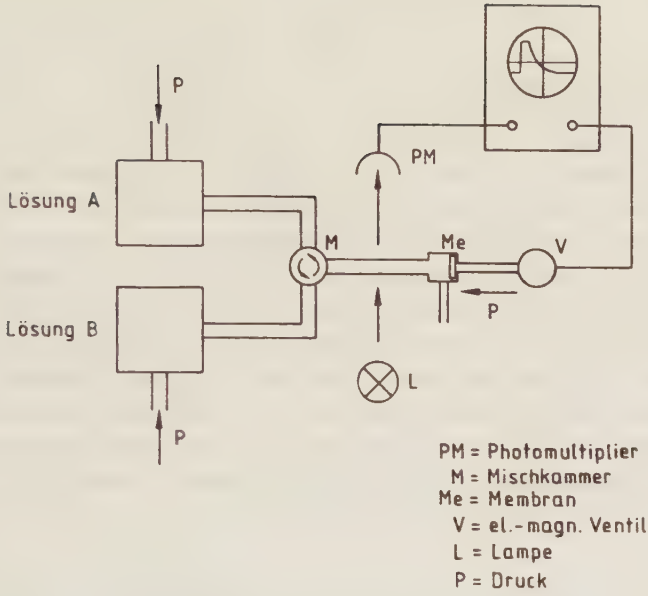


Abb.3: Das Prinzip der Stopped flow-Apparatur der Firma Union Giken

Beobachtung des Reaktionsgemisches). Die Strömungsgeschwindigkeit im Beobachtungsrohr mit einer Länge von 20 mm und einem Durchmesser von 2 mm beträgt bei dieser Apparatur 9 m/s. Owens und Margerum sind so in der Lage Reaktionen mit einer Halbwertszeit von 0.04 ms zu registrieren. Der Lösungsverbrauch beträgt nur 3 - 4 ml.

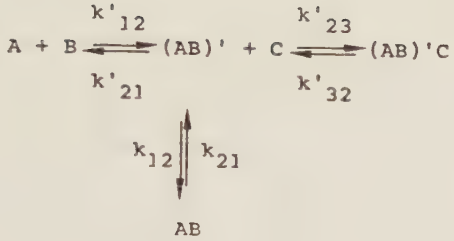
1.2. Aufgabenstellung

Die Aufgabenstellung dieser Arbeit beinhaltet zwei wesentliche Ziele:

Ein Ziel ist die Entwicklung einer Drei-Komponenten-Stopped flow-Apparatur mit zwei Mischsystemen und zwei Doppeldetektionskanälen. Der Aufbau dieser Apparatur soll die Untersuchung komplexer Reaktionssysteme erlauben. Die Apparatur soll die Mischung von drei Reaktionslösungen und die optische Detektion der entstehenden Reaktionsgemische ermöglichen. Die Mischung von drei Lösungen A,B,C soll jedoch nicht auf direktem Wege (in einer Mischkammer) erfolgen, sondern nacheinander in zwei Schritten. Diese Methode kann nur mit einer Apparatur mit zwei Mischkammern realisiert werden. Die Reaktionsschritte können mit dem folgenden Reaktionsschema verdeutlicht werden:

$$A + B \underset{k_{21}}{\overset{k_{12}}{\rightleftharpoons}} AB + C \underset{k_{32}}{\overset{k_{23}}{\rightleftharpoons}} ABC \qquad (I)$$

Ein Sonderfall liegt vor, wenn nicht AB mit C reagiert, sondern ein vorgelagerter Zwischenzustand (AB)'. Das Reaktionsschema ändert sich dann wie folgt:



(II)

Die mögliche Realisierung dieser Methode mit einer Drei-Komponenten-Stopped flow-Apparatur und deren prinzipielle Funktionsweise werden im folgenden kurz dargelegt. Das Prinzip dieser neu zu entwickelnden Apparatur wird in Abb.4 gezeigt.

Die Ausgangslösungen A und B werden mittels Gasdruck durch die erste Mischkammer in die erste Beobachtungskammer vorgedrückt. Das entstandene Reaktionsgemisch kann nun mit dem ersten Stopventil SV1 abgestoppt werden. Nach dem Abstoppen wird die zeitliche Änderung der Konzentration eines Ausgangsstoffes an der ersten Beobachtungskammer photometrisch verfolgt. Die zeitlichen Konzentrationsänderungen sollen sowohl mit Absorptions- als auch mit Fluoreszenzmessungen registriert werden können. Nach Ablauf einer vorgewählten Verzögerungszeit wird das Reaktionsgemisch AB in die zweite Mischkammer vorgedrückt und mit einer dritten Ausgangslösung C gemischt. Das Reaktionsgemisch wird nach dem Abstoppen mit dem zweiten Stopventil SV2 an der zweiten Beobachtungskammer beobachtet. Diese Meßmethode wird in der Arbeit im folgenden als Doppel-Stopped

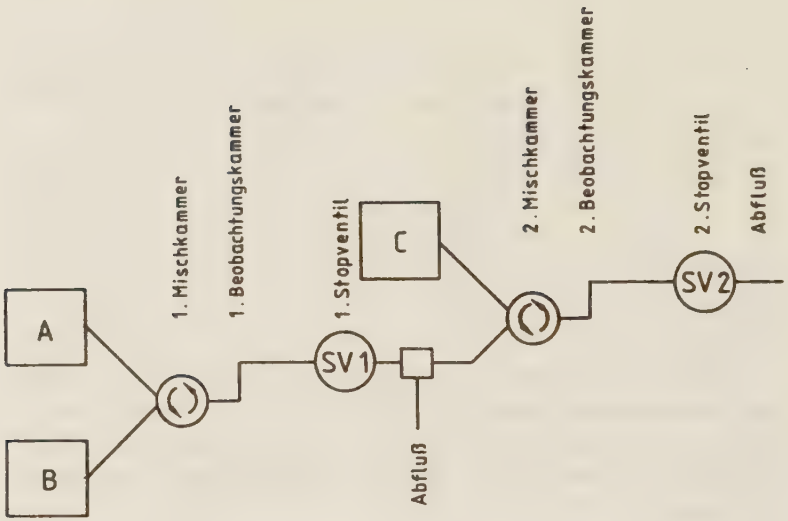


Abb.4: Schematische Darstellung der Drei - Komponenten - Stopped flow Apparatur

flow-Methode mit variabel einstellbarer Verzögerungszeit (DSFV) bezeichnet. Bei Einstellung einer Verzögerungszeit ist es möglich das erste Reaktionsgemisch während eines Zwischenzustandes mit C zu mischen und zu untersuchen. Ein Spezialfall dieser Meßmethode ist das Messen ohne Einstellung einer Verzögerungszeit. Das Reaktionsgemisch AB wird dann ohne einen Zwischenstop durch das erste Stopventil SV1 mit C gemischt. Diese Meßmethode wird als Doppel-Stopped flow-Methode ohne Verzögerungszeit (DSF) bezeichnet. Die Apparatur soll ferner im Einfach-Stopped flow-Meßmodus (ESF) verwendet werden können. Zur Realisierung

dieser Apparatur sind die Entwicklung eines Kanülensystems und eine elektronische Steuerung des Strömungsflusses erforderlich.

Das zweite Ziel dieser Arbeit beinhaltet die Untersuchung der Kinetik der Komplexbildungsreaktion von Calcimycin (A23187) mit den Erdalkaliionen Mg^{++} und Ca^{++}. Um einen Beitrag zum besseren Verständnis der Komplexbildungsmechanismen von Calcimycin mit Mg^{++} und Ca^{++} zu leisten, sollen Stopped flow- und Temperatur-Sprung-Experimente in homogener Lösung durchgeführt werden. Ziel dieser Experimente ist die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Komplexbildung und damit die Aufklärung der Reaktionsmechanismen sowie der Erdalkaliionenselektivität.

Als vorbereitende Studien sind die Gleichgewichtskonstanten der Protolyse des Calcimycins sowie der Komplexbildung des Calcimycins mit Mg^{++} und Ca^{++} bei verschiedenen pH-Werten zu bestimmen. Für die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten und der Geschwindigkeitskonstanten sollen die Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften des Calcimycins genutzt werden.

Alle Messungen sollen in 30% Wasser in Methanol (Gew./Gew.) durchgeführt werden. Calcimycin ist in reinem Wasser nur sehr schlecht löslich/12/. Das 30% Wasser in Methanol-Gemisch (Gew./Gew.) kann im Hinblick auf die Untersuchungen von Transportmechanismen in Membranen als Modellmedium für die Wasser-Membran-Grenzschicht benutzt werden/13/. Calcimycin ist der aktivste niedermolekulare Ca^{++}-Carrier in Membranen. Die Dynamik der Komplexbildung ist daher für das Verständnis der Transporteigenschaften des Calcimycins in Membranen von großem Interesse.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Ausgewählte hydrodynamische Prinzipien

Die Konstruktion und Anwendung einer nach strömungsmechanischen Prinzipien funktionierenden Apparatur setzt die Kenntnis hydrodynamischer Gesetzmäßigkeiten voraus. Für eine optimale Konstruktion einer Strömungsapparatur ist es notwendig, wichtige physikalische Größen - wie Volumenstrom, Strömungswiderstand, Reynold'sche Zahl etc. - abschätzen zu können. Ein Grundgesetz der Hydrodynamik ist die Erhaltung der Masse, die in der Kontinuitätsgleichung ihren Ausdruck findet. Die Erhaltung der Masse wird durch die Konstanz des Produktes aus dem Querschnitt A einer Röhre und der Strömungsgeschwindigkeit v der hindurchfließenden Flüssigkeit bzw. durch die Konstanz des Volumenstromes $\dot{V}$ ausgedrückt.

$$A \cdot v = \dot{V} = \text{const.} \qquad (1)$$

Während die Berechnung des Volumenstromes für laminare Strömungsverhältnisse möglich ist (Gesetz von Hagen-Poiseuille)/14/, kann bei turbulenten Strömungen für diese Größe keine exakte Gleichung angegeben werden. Nach Messung des Volumenstromes kann die Strömungsgeschwindigkeit einer Flüssigkeit in einer Röhre mit Glg.(1) berechnet werden. Die Messungen des Volumenstromes werden im Abschn.3.2.2. beschrieben. Eine die Strömungsverhältnisse gut charakterisierende Größe ist die Reynold'sche Zahl Re.

Sie ist das Verhältnis von Beschleunigungsarbeit zu Reibungsarbeit. Ist die Reibungsarbeit groß gegenüber der kinetischen Energie, so ist Re klein und es herrschen laminare Strömungsverhältnisse vor. Im umgekehrten Fall bestimmen Turbulenzen das Strömungsbild. Die Reynold'sche Zahl wird durch den folgenden Ausdruck wiedergegeben:

$$Re = \frac{v \cdot l}{V} \qquad (2)$$

Die Größe l ist die charakteristische Länge, die bei der Strömung einer inkompressiblen Flüssigkeit in einem Rohr mit Kreisquerschnitt gleich deren Durchmesser d ist /15/. Die Geschwindigkeit v ist die über dem Querschnitt gemittelte Strömungsgeschwindigkeit und V die kinematische Viskosität.

Zur Abgrenzung turbulenter Strömungsverhältnisse gegenüber laminaren geben die meisten Autoren in der Literatur eine kritische Reynold'sche Zahl (Re_{krit}) von 2320 an /16/. Die kritische Geschwindigkeit für Wasser würde z.B. in einem kreisrunden Rohr dann 1.55 m/s betragen, wenn man für den Durchmesser des Rohres d = 1.5 mm wählt.

In turbulenten Strömungen finden Mischbewegungen sowie Wirbelablösungen statt /17/, die sich mit dem technischen Parameter Rohrwiderstand ausdrücken lassen. Die Bestimmung des Rohrwiderstandes setzt die Berechnung der Widerstandszahl voraus. Sie ist eine Funktion der Reynold'schen Zahl. Entsprechend der numerischen Größe der Reynold'schen Zahl unterteilt man die Berechnung der Widerstandszahl in drei Fälle /18/:

a) $Re < Re_{krit}$

$$\zeta = \frac{64}{Re} \tag{3}$$

b) $Re_{krit} \leq Re \leq 10^5$, nach Blasius

$$\zeta = \frac{0.316}{Re^{-0.25}} \tag{4}$$

c) $10^5 \leq Re \leq 10^8$, nach Nikuradse

$$\zeta = 0.0032 + \frac{0.221}{Re^{0.237}} \tag{5}$$

Die Glg.(4) und (5) wurden empirisch bestimmt. Diese Formeln gelten nur für technisch glatte Rohre. Das heißt: es ist ein Rohrrauhigkeitswert von etwa 10^{-3} mm zugelassen. Mit der Kenntnis des Volumenstromes, der Widerstandszahl und den geometrischen Dimensionen kann man den Druckverlust Δp in einem Rohr bestimmen. Es gilt /19/:

$$\Delta p = \frac{8 \cdot l \cdot \rho \cdot \zeta}{\pi^2 d^5} \cdot \dot{v}^2 = R_o \cdot \dot{v}^2 \tag{6}$$

R_o wird als Rohrwiderstand bezeichnet, ρ ist die Dich-

te. Der Druckverlust an Ventilen, Rohrkrümmungen und -knien wird nach der folgenden Gleichung bestimmt:

$$\Delta p = \frac{8 \cdot \rho \cdot \zeta}{\pi^2 \cdot d^4} \cdot \dot{v}^2 = R_o \cdot \dot{v}^2 \qquad (7)$$

Die Widerstandszahlen für Ventile, Rohrkrümmungen und -knien lassen sich schwieriger bestimmen. Man geht deshalb entweder von Literaturdaten aus oder schätzt ein ζ ab, das näherungsweise die Realität wiedergibt.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Gleichungen erlauben eine für die Konstruktion einer Strömungsapparatur erste wichtige Abschätzung der Strömungsverhältnisse. Im Abschn.3.2.2. werden die experimentell ermittelten Reynold'schen Zahlen des gesamten Systems und die Druckverluste für große Strömungswiderstände angegeben.

2.2. Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten für reversible Reaktionen erster und zweiter Ordnung

Ziel von Stopped flow-Experimenten ist die Bestimmung der Reaktionsordnung und der Geschwindigkeitskonstanten einer Reaktion. Das Experiment liefert beide Größen nicht direkt. Es wird daher die zeitliche Änderung der Konzentration eines Ausgangsstoffes mittels Messung einer zeitlichen Änderung eines physikalischen Parameters bestimmt. Das Auswerten der experimentellen Daten erfordert die Anwendung mathematischer Gleichungen, mit denen die Geschwindigkeitskonstanten bestimmt werden können. Im folgenden werden mathematische Gleichungen formuliert, die die Zeit-

abhängigkeit eines Ausgangsstoffes A mit der Konzentration c_A für Reaktionen erster und zweiter Ordnung beschreiben:

a)Reaktion erster Ordnung:

Die Reaktionsgleichung für eine reversible Reaktion erster Ordnung lautet:

$$A \underset{k_{21}}{\overset{k_{12}}{\rightleftharpoons}} B \qquad \text{(III)}$$

Die Zeitabhängigkeit der Konzentration c_A läßt sich durch den folgenden Ausdruck beschreiben:

$$-\frac{dc_A}{dt} = k_{12}c_A - k_{21}c_B \qquad (8)$$

Aus dieser Gleichung erhält man für den zeitlichen Verlauf der Konzentration c_A die folgende Gleichung /20/:

$$c_A = (c_A^o - c_{A_\infty})e^{-(k_{12} + k_{21})t} \qquad (9)$$

Für eine irreversible Reaktion ($k_{21} = 0$) gilt /21/:

$$c_A = c_A^o\, e^{-k_{12}t} \qquad (10)$$

Hier bedeuten: c_A^o = Anfangskonzentration des Ausgangsstoffes A

c_{A_∞} = Gleichgewichtskonzentration von A
c_A = Konzentration von A zum Zeitpunkt t
c_B = Konzentration von B zum Zeitpunkt t
k_{12} = Geschwindigkeitskonstante für die Hinreaktion
k_{21} = Geschwindigkeitskonstante für die Rückreaktion

b) Reaktion zweiter Ordnung:

Die Reaktionsgleichung einer Reaktion zweiter Ordnung kann wie folgt lauten:

$$A + B \underset{k_{21}}{\overset{k_{12}}{\rightleftharpoons}} C \qquad (IV)$$

Die Bezeichnungen für B und C sind dieselben wie sie oben für A definiert wurden.

Für die zeitliche Abnahme der Konzentration von A gilt der folgende allgemeine Ansatz /22/:

$$-\frac{dc_A}{dt} = k_{12}c_Ac_B - k_{21}c_C \qquad (11)$$

$$= k_{12}c_A(c_B^o - c_A^o + c_A) - k_{21}(c_A^o - c_A) \qquad (12)$$

Betrachtet man Glg.(12) für ein Gleichgewicht und setzt $c_A = c_{A_\infty}$, so erhält man einen Ausdruck für die Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion:

$$k_{21} = \frac{c_A(c_B^o - c_A^o + c_{A_\infty})}{c_A^o - c_{A_\infty}} \qquad (13)$$

Nach Einsetzen von Glg.(13) in Glg.(12) erhält man:

$$\frac{dc_A}{dc_A^2 + uc_A + v\, c_A^o c_{A_\infty}} = -k_{12}dt \qquad (14)$$

Hier bedeuten:

$$u = \frac{c_{A_\infty}^2 - c_A^{o2} + c_A^o c_B^o}{c_A^o - c_{A_\infty}} \qquad (14.a)$$

$$v = \frac{c_A^o - c_B^o - c_{A_\infty}}{c_A^o - c_{A_\infty}} \qquad (14.b)$$

Durch anschließende Partialbruchzerlegung und Integration findet man eine Lösung für das zeitliche Verhalten der Konzentration von A:

$$c_A = \frac{c_{A_\infty} + xe^{-yk_{12}t}}{1 - ze^{-yk_{12}t}} \qquad (15)$$

Hier bedeuten:

$$x = \frac{(c_B^o - c_A^o + c_{A_\infty})(c_A^o - c_{A_\infty})}{c_B^o} \qquad (15.a)$$

$$y = \frac{c_A^o c_B^o - (c_A^o - c_{A_\infty})^2}{c_A^o - c_{A_\infty}} \qquad (15.b)$$

$$z = \frac{(c_A^o - c_{A_\infty})^2}{c_A^o c_B^o} \qquad (15.c)$$

Die Lösung für $c_A(t)$ einer irreversiblen Reaktion zweiter Ordnung lautet /23/:

$$c_A = \frac{c_A^o - c_B^o}{1 - \frac{c_B^o}{c_A^o} e^{(c_B^o - c_A^o)k_{12}t}} \qquad (16)$$

Diese Gleichung erhält man aus Glg.(15), wenn man in Glg.(13) $k_{21} = 0$ setzt.

3. Die Drei-Komponenten-Stopped flow-Apparatur

3.1. Arbeitsweise und Gesamtaufbau der Apparatur

In diesem Abschnitt werden die Arbeitsweise und der Gesamtaufbau der Apparatur kurz erläutert. Im folgenden wird die Arbeitsweise der Apparatur anhand von Abb.5 erklärt.

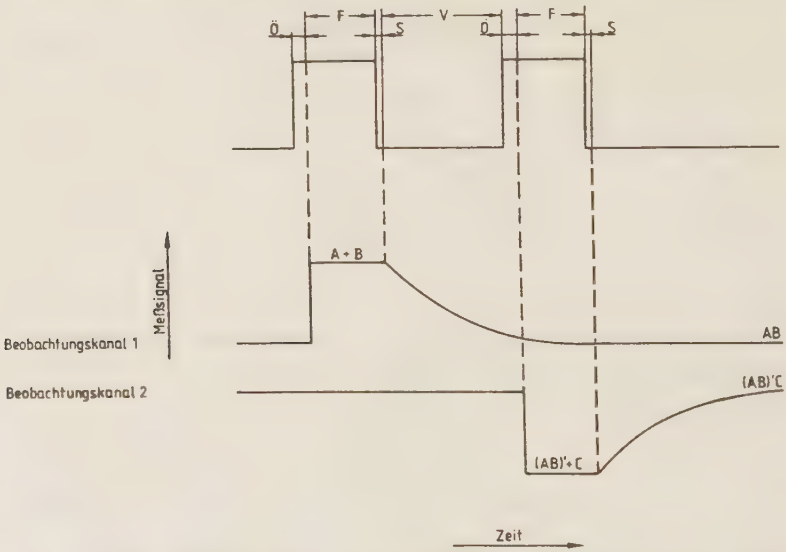


Abb.5: Impulsdiagramm der Stopventile und Meßsignale auf den Beobachtungskanälen 1 und 2 für die DSFV - Methode. In der Abbildung bedeuten: Ö = Öffnungszeit, F = Flußzeit, S = Schließzeit, V = Verzögerungszeit.

Zwei unter Stickstoffdruck stehende Ausgangslösungen A und B werden durch die erste Mischkammer in die erste

Beobachtungskammer gedrückt und nach einer vorgewählten Flußzeit mit dem ersten Stopventil SV1 abgestoppt. Die Beobachtung des Reaktionsgemisches AB erfolgt unmittelbar nach dem Abstoppen. Für die Beobachtung des Reaktionsgemisches wird ein monochromatisches Lichtbündel mit Hilfe eines Linsensystems auf die Beobachtungskammer fokussiert. Ein Teil der Intensität dieses Lichtbündels ist auf den Referenzphotomultiplier PM1 (siehe Abb.6) gerichtet, um durch Differenzbildung des Meßsignals mit dem Referenzsignal Schwankungen der Lichtintensität zu verringern. Das aus der Beobachtungskammer tretende Lichtbündel wird für Absorptions- und Transmissionsmessungen vom Photomultiplier PM3 detektiert. Senkrecht zu dieser Detektion ist eine Messung von Fluoreszenzstrahlung mit dem Photomultiplier PM5 möglich. Die Photomultiplier sind an ein Steuer- und Kontrollpult angeschlossen, das eine Verstärkung der elektrischen Signale und eine Differenzbildung von Meß- und Referenzsignal ermöglicht (vgl. Abschn.3.4.2.). Die Meßsignale werden auf einem digitalen Speicheroszilloskop (Nicolet) registriert und abgespeichert (vgl. Abschn.3.4.3.). Diese Meßart entspricht der ESF-Methode.

Mit der Doppel-Stopped flow-Methode kann nach Ablauf einer vorgewählten Verzögerungszeit (siehe Abb.5) das Reaktionsgemisch (AB)' in eine zweite Mischkammer gedrückt werden, wo es mit der Ausgangslösung C gemischt wird. Das dort gebildete Reaktionsgemisch (AB)'C fließt nach der Mischung durch die zweite Beobachtungskammer. Mit dem zweiten Stopventil SV2 wird das Reaktionsgemisch (AB)'C gestoppt. Die Detektion an der zweiten Stufe und die Registrierung der Meßsignale erfolgen wie an der ersten Stufe.

Die beschriebenen Meßarten werden mit einer Apparatur

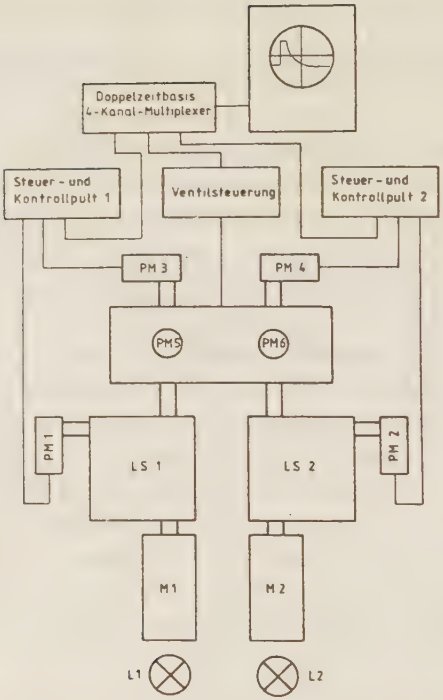


Abb.6: Gesamtaufbau der Drei-Komponenten-Stopped flow-Apparatur. L1,2 = Lampen, M1,2 = Monochromatoren, L1,2 = Linsensysteme, PM1,2 = Referenzphotomultiplier, PM3,4 = Meßphotomultiplier für Absorptionsmessungen, PM5,6 = Meßphotomultiplier für Fluoreszenzmessungen.

realisiert, deren Gesamtaufbau in Abb.6 schematisch dargestellt wird. Die Apparatur besteht aus einem mechanischen Kanülensystem (siehe Abb.7), zwei Lampen, zwei Monochroma-

toren, zwei Linsensystemen, sechs Photomultipliern für die Detektion, elektronischen Kontroll- und Steuereinheiten und Geräten zur Registrierung und Speicherung der Meßsignale.

Eine detaillierte Darstellung des Aufbaus und der Funktionsweisen der verschiedenen Teile der Apparatur wird in den nächsten Abschnitten gegeben.

3.2. Mechanischer Aufbau

Um den Lösungsverbrauch bei Anwendung der DSFV-Methode minimal zu halten, ist die folgende prinzipielle Fragestellung von Bedeutung: Wie kann das erste Reaktionsgemisch ohne ein Vordrücken der Lösungen mit den Stoffen A und B in die zweite Mischkammer vorgetrieben werden?

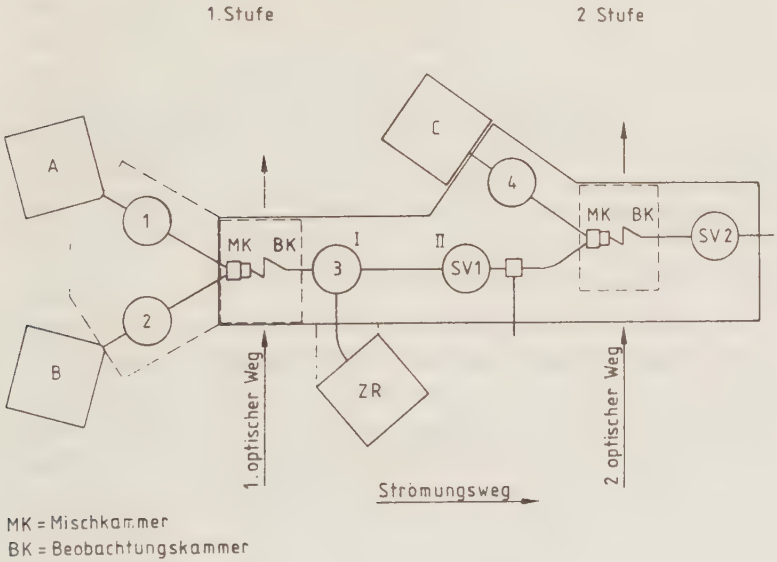


Abb.7: Mechanischer Aufbau der Apparatur

Ein bestimmtes Volumen, das sich in einer Kanüle zwischen den in Abb.7 markierten Punkten I und II befindet, muß in einem zweiten Schritt durch die zweite Mischkammer und die zweite Beobachtungskammer gedrückt werden. Als Lösung dieses Problems bietet sich der Einbau eines 3-Wege-Ventils in das Kanülensystem an, das mit dem Reservoir ZR verbunden ist. Das Reaktionsgemisch, das sich zwischen den Punkten I und II befindet, kann so mit dem im Reservoir ZR befindlichen Lösungsmittel nach Ablauf der Verzögerungszeit vorgedrückt werden. Um die Alterungszeit des ersten Reaktionsgemisches minimal zu halten, wird das 3-Wege-Ventil so nah wie möglich hinter der ersten Beobachtungskammer installiert.

Die Ventile 1,2 und 4 haben die Aufgabe - bei sich eventuell einstellenden Druckdifferenzen zwischen den Reservoirs - ein Fließen der Lösungen von einem Reservoir über die Mischkammer zum anderen Reservoir zu verhindern. Die Forderung nach der Inertheit aller mechanischen Teile der Apparatur läßt keinen großen Spielraum in der Auswahl der Materialien. Für die Reservoirs sowie die Halterungen für die Misch- und Beobachtungskammern wird Kel-F (Polychlortrifluoräthylen) verwandt. Kel-F hat denselben Inertheitsgrad wie Teflon (Polytetrafluoräthylen), ist jedoch härter und läßt sich somit besser mechanisch bearbeiten. Wie man aus Tab.I ersieht, ist Kel-F ein stabiler Kunststoff mit geringem linearen Ausdehnungskoeffizient.

Ungünstig ist die geringe Wärmeleitfähigkeit. Sie ist etwa um einen Faktor 10 geringer als bei Stahl. Das bedeutet, daß bei der Konstruktion der zu thermostatisierenden Kel-F-Teile, auf geringe Wanddicken zu achten ist. Der größte Teil der Mechanik befindet sich in einer abgeschlossenen

Material / Eigenschaft	Teflon	Kel-F
Verformung bei einer Druckbelastung von 70 kg/cm^2 nach 24 h bei 23°C [%]	3-6	0.4
linearer Ausdehnungskoeffizient bei 23°C [mm/m]	$8 \cdot 10^{-5}$	$4.5 \cdot 10^{-5}$
linearer Ausdehnungskoeffizient bei 100°C [mm/m]	$10 \cdot 10^{-5}$	$7 \cdot 10^{-5}$
Warmeleitfähigkeit $[\frac{cal}{sec\ cm\ grd}]$	$177 \cdot 10^{-4}$	$177 \cdot 10^{-4}$

Tab.I: Physikalische Eigenschaften von Kel - F und Teflon /24/.

Thermostatisierwanne. Die Reservoirs werden von der Thermostatisierflüssigkeit umspült und stehen alle mit der Thermostatisierwanne in Verbindung. Die Kanülen, die die beiden ersten Reservoirs für die Lösungen A und B mit der ersten Mischkammerhalterung verbinden sowie die Kanülenverbindung des Reservoirs ZR zum dem 3-Wege-Ventil 3 sind mit Styropor isoliert. Der Wärmeaustausch mit der Umgebung wird so erheblich verlangsamt. Alle Teile des Kanülensystems werden mittels V2A-Kanülen mit einem Durchmesser von 1.5 mm verbunden. Das Arbeiten mit noch größerem Inertheitsgrad wird möglich, wenn man die eingesetzten V2A-Kanülen gegen Platin/Iridium - Kanülen austauscht. Die Kanülen sind direkt an die Kunststoffteile aufgesetzt und mit einem Vitonring abgedichtet.

3.2.1. Die Einzelkomponenten des mechanischen Kanülensystems

3.2.1.1. Die Reservoirs

Die aus Kel-F gefertigten Reservoirs haben eine Kammer für Lösungen mit einem Volumen von ungefähr 21 ml.

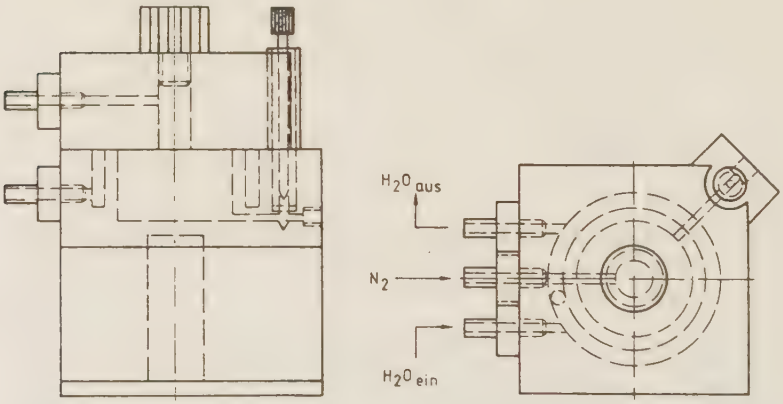


Abb.8: Seitenansicht und Aufsicht eines Reservoirs

Die Lösungen werden direkt durch eine 1.5 mm-Bohrung von den Reservoirs in die Kanülen gedrückt. Der Volumenstrom kann mit einem in den Strömungsweg gedrehten Kel-F-Hahn unterbrochen werden. Es ist daher leicht möglich, die beiden Reservoirs für die Lösungen A und B unabhängig voneinander zu leeren, zu säubern und zu füllen. Unterhalb der Kammer befindet sich ein kleiner Hohlraum für einen kleinen Motor mit einem auf die Welle montierten Magneten.

Ein Temperaturgradient in der Lösung wird so durch Rühren mit einem mit Teflon ummantelten Magnetrührer,der sich in der Lösung befindet, verhindert.

Nähere Einzelheiten zur Konstruktion der Reservoirs sind in Abb.8 dargestellt.

3.2.1.2. Das Ventilsystem

Entscheidende Kriterien für die Auswahl der Ventile sind kurze Schließzeiten und Inertheit. Das in den Strömungsweg installierte Ventil soll kein Totvolumen haben, so daß sich keine Lösungsreste von vorangegangenen Messungen im Ventil festsetzen können. Aufgrund von Tests fällt die Entscheidung zugunsten einer Ventileinheit,die sich aus zwei Ventilen zusammensetzt:

a) elektromagnetisches Ventil (Norgren Enots)

b) inertes pneumatisch-mechanisches Ventil (Latek)

Das elektromagnetische Ventil dient zur Ansteuerung des mechanischen Ventils, das im Strömungssystem integriert ist. Es versorgt das mechanische Ventil beim Schließen mit Gasdruck und entlastet die Verbindungsleitung zwischen beiden Ventilen beim Öffnen. Das elektromagnetische Ventil kann maximal einen Druck von 9 bar steuern. Das mechanische Ventil wird mit 4 - 6 bar angesteuert und ist im Strömungsweg bis maximal 35 bar belastbar. Es ist ein Gleitventil. Bei Druckentlastung wird ein Gleiter, der eine Durchgangsbohrung von 1.5 mm hat, von einer Feder in Arbeitsposition gebracht, so daß der Weg für die Lösung frei wird. Bei Druckbelastung wird die Feder hinuntergedrückt und das Ventil wird geschlossen. Der aus Kel-F bestehende Gleiter

wird von vier Teflon-Endscheiben gehalten, die gleichzeitig der Abdichtung des Gleiters dienen. Die auf Durchgang vorzunehmende Justierung der Ventile erfolgt durch dafür vorgesehene Schrauben an den Ventilen.

Eine sich bei der Drei-Komponenten-Stopped flow-Apparatur auf alle Messungen auswirkende Größe ist die Schaltzeit der Ventileinheiten. Die Schaltzeiten aller Ventileinheiten werden experimentell bestimmt. Die Kenntnis der Schaltzeiten ermöglicht eine Feinabstimmung der Ventile zueinander (siehe Abschn.3.4.1.). Die Bestimmung der Schaltzeiten der elektromagnetischen Ventile in Abhängigkeit vom Druck des Stickstoffs, der durch das Ventil strömt, wird mit einer elektronischen Schaltung (siehe Abb.9) vorgenommen.

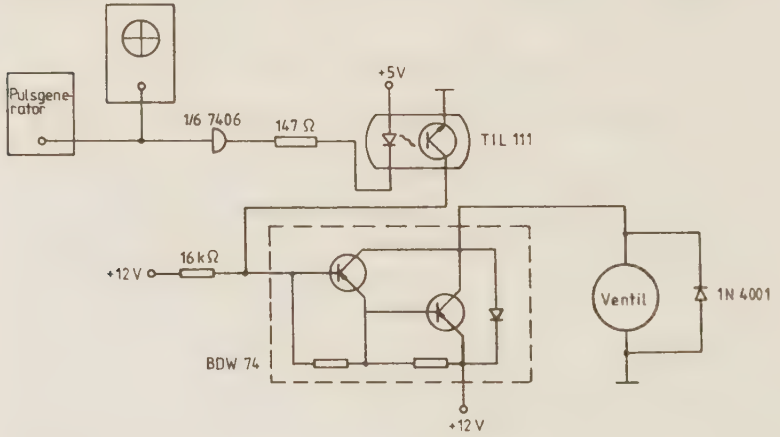


Abb.9: Elektronische Schaltung zur Bestimmung der Schaltzeiten der elektromagnetischen Ventile

Bei diesen Messungen werden die Ventile mit einem

Rechteckpuls entsprechender Pulsweite, der von einem Pulsgenerator erzeugt wird, geöffnet. Durch Verringerung der Pulsweite, die so lange erfolgte, bis das Öffnen der Ventile noch akustisch wahrgenommen werden kann bzw. der Stickstoff nach dem Öffnen durch die Ventile strömt, werden die Öffnungszeiten bestimmt. Diese experimentell ermittelten Minimalwerte der Pulsweite entsprechen den Öffnungszeiten der elektromagnetischen Ventile. Die am Pulsgenerator eingestellte Pulsperiode beträgt 119.95 ms. Abb.10 zeigt die experimentell gefundenen Öffnungszeiten der elektromagnetischen Ventile in Abhängigkeit vom Stickstoffdruck.

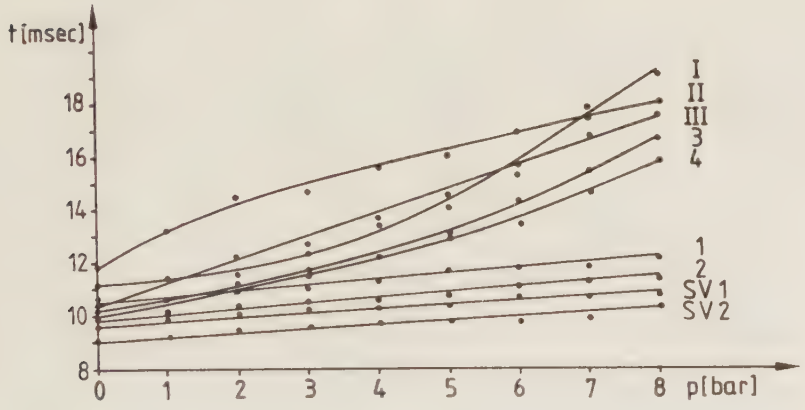


Abb.10:Die Öffnungszeiten der elektromagnetischen Ventile in Abhängigkeit vom Druck

Aufgrund dieser Messungen werden die Ventile mit den kürzesten Öffnungszeiten als Steuerungsventile für die mechanischen Ventile (sechs Ventile), die anderen drei Ven-

tile (I, II, III) für die Druckversorgung bzw. -entlastung an den Reservoirs eingesetzt. Die Öffnungszeiten konnten auf etwa drei Prozent genau bestimmt werden. Die genaue Bezeichnung der Ventile geht aus Abb.7 hervor.

Die Messungen der Schaltzeiten der Ventileinheiten wird mit einer Phototransistorschaltung realisiert. Am Ausgang des mechanischen Ventils wird ein Phototransistor installiert (siehe Abb.11), dessen Spannungssignale von einem digitalen Speicherosszilloskop (Nicolet) in Abhängigkeit von der Zeit registriert werden.

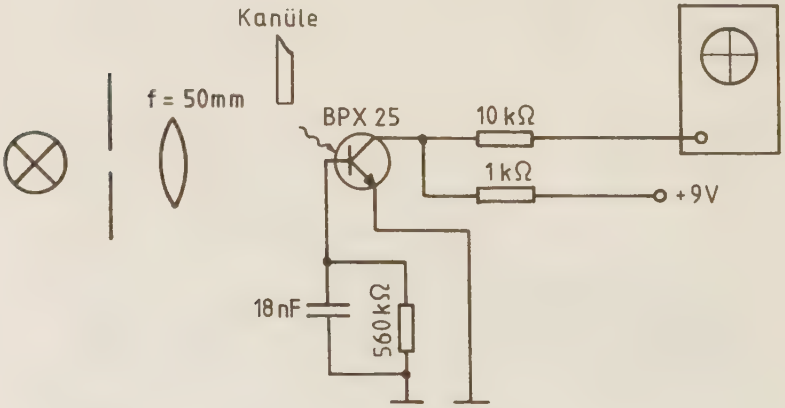


Abb.11: Phototransistorschaltung für die Messung der Schaltzeiten der Ventileinheiten

Die Spannung am Phototransistor erhöht sich, sobald eine Flüssigkeit (z.B. Farbstofflösung) aus dem Ventil fließt. Sie nimmt beim Schließen des Ventils wieder ab. Das mechanische Ventil wird mit dem elektromagnetischen

Ventil geöffnet, indem dieses ein 12V-Gleichspannungssignal erhält. Die Flüssigkeit fließt nicht sofort aus dem mechanischen Ventil, da der Gleiter des Ventils zuerst von der Ventilfeder in die entsprechende Position gebracht werden muß. Das Zeitintervall zwischen der positiven Flanke des 12V-Signals für das elektromagnetische Ventil und dem ersten registrierten Zeitpunkt, der dem Beginn des Fließens der Flüssigkeit aus dem mechanischen Ventil entspricht, ist die Öffnungszeit der Ventileinheit. Die Schließzeit ist gleich dem Zeitintervall zwischen der negativen Flanke des 12V-Signals und dem letzten vom Phototransistor angezeigten Spannungssignal, das dem Ende des Fließens der Flüssigkeit entspricht.

Zum Öffnen des Ventils werden die Reibungskräfte, die zwischen dem Gleiter und den Teflon-Endscheiben des Ventils wirken, mit der Ventilfeder nicht so schnell überwunden wie bei der direkten Wirkung des Gasdruckes auf den Gleiter. Die Öffnungszeiten sind somit größer als die Schließzeiten und bei allen mechanischen Ventilen aufgrund der verschiedenen Beträge der Reibungskräfte unterschiedlich groß. Die Schließzeiten verhalten sich nahezu gleich (ungefähr 50 ms). In der Schließzeit sind die Ansprechzeiten der Ventile und die Zeit enthalten, die die Ventile brauchen, um von der Arbeitsstellung in die Stopstellung zu gelangen. Durch Hinunterdrücken des Gleiters wird die Bohrung des Gleiters gegenüber der sich daran anschließenden Kanüle verschoben. Diese zeitabhängige Verringerung der Querschnitte an den Übergangsstellen Gleiter/Kanüle bewirken dort eine Erhöhung der Strömungsgeschwindigkeiten. Die Zeit, in der die Flüssigkeit zum Stoppen gebracht wird, ist somit viel kleiner als die gemessene Schließzeit. Aufgrund dieser Gegebenheit ist es möglich, die Ventile in

einer Stopped flow-Apparatur einzusetzen und in einem Zeitbereich, der kleiner als 5 ms ist, zu messen.

Die gemessenen Öffnungszeiten der Ventileinheiten werden an einer elektronischen Ventilsteuereinheit (siehe Abschn.3.4.1.) eingestellt. Somit kann eine optimale Abstimmung der Ventile zueinander erreicht werden.

3.2.1.3. Die Mischkammer(MK)

Die Mischkammer ist eine 4-jet-tangentiale Mischkammer, die aus zwei Kel-F-Teilen besteht. Am Eingang der Mischkammer werden zwei Stromzuleitungen in vier Kanäle aufgeteilt. In Abb.12.a sieht man, daß die Strömungswege in zwei Mischebenen aufeinandertreffen. Die Mischkammer wurde am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen konstruiert und gebaut.

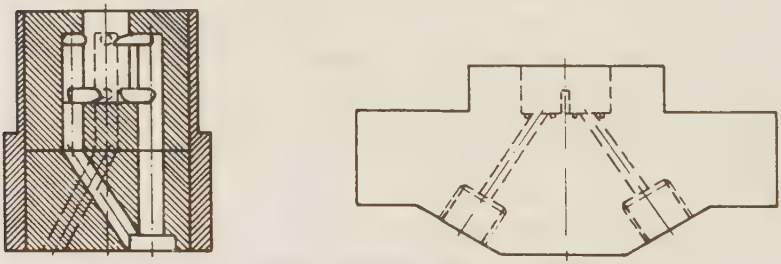


Abb.12:a - Querschnitt der Mischkammer, b - Mischkammerhalterung

Die Mischkammer wird auf eine Halterung aus Kel-F (siehe Abb.12.b) gesteckt.

3.2.1.4. Die Beobachtungskammer(BK)

Die hier entwickelte Beobachtungskammer wird aus UV-durchlässigem Quarzglas von Hellma gefertigt. Alle Teile der Beobachtungskammer, die nicht optischen Zwecken dienen bestehen aus geschwärztem Quarzglas (Abb.13)

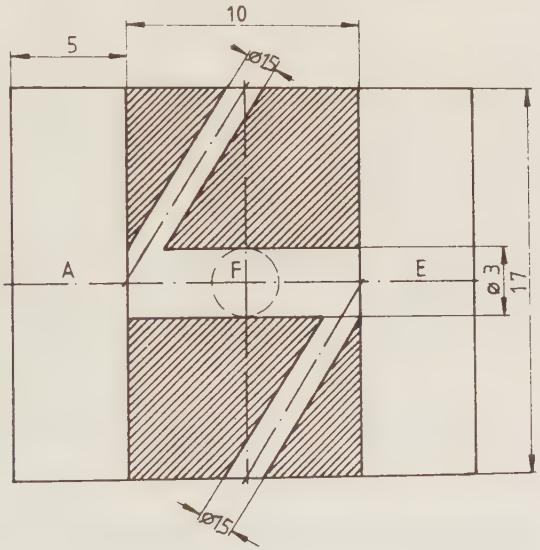


Abb.13:Querschnitt der Beobachtungskammer. E = Einstrahlfenster, A = Absorptionsfenster, F = Fluoreszenzfenster.

Lichtstreuungen, -reflexionen und -leitungen in der Beobachtungskammer sollen so reduziert werden. Das Arbeiten mit Drücken bis zu 8 bar erfordert für die Beobachtungskammer 5 mm dicke Seitenwände.

Die Beobachtungskammer und die Mischkammerhalterung mit Mischkammer werden in einem Block aus Kel-F montiert. Zur Abdichtung des Überganges Mischkammer/Beobachtungskammer wird ein Teflonring eingesetzt.

3.2.2. Hydrodynamische Eigenschaften und die Bestimmung der Totzeiten der Apparatur

Für die strömungstechnische Charakterisierung eignet sich der Volumenstrom. Der Volumenstrom gibt das Volumen an, das pro Zeiteinheit durch das Kanülensystem fließt. Eine Phototransistorschaltung (siehe Abb.11) ermöglicht die Messung des Volumenstromes. Der Phototransistor wird, wie in Abschn.3.2.1.2. beschrieben, hinter verschiedenen mechanischen Bauteilen installiert. Die zeitliche Änderung der Spannung am Phototransistor wird auf einem digitalen Speicherosszilloskop (Nicolet) gespeichert. Die Farbstofflösung wird am Stromausgang in einem Meßzylinder aufgefangen und deren Volumen gemessen. Der Quotient aus diesem Volumen und dem Zeitintervall, in welchem sich die Spannung ändert, ergibt den Volumenstrom.

3.2.2.1. Charakterisierung der Mischkammer

Um in der Mischkammer eine gute Durchmischung gewährleisten zu können, muß in diesem Teil der Apparatur die Turbulenz bzw. die Strömungsgeschwindigkeit groß sein. Als

Maß für die Turbulenz wird die Reynold'sche Zahl für die Strömung hinter der Mischkammer mit dem experimentell bestimmten Volumenstrom für die Drücke 2, 4, 6, 8 bar ermittelt. Aus den daraus berechneten Reynold'schen Zahlen folgt, daß bei allen verwendeten Drücken turbulente Strömungsverhältnisse herrschen, wie in Abb.14 zu sehen ist.

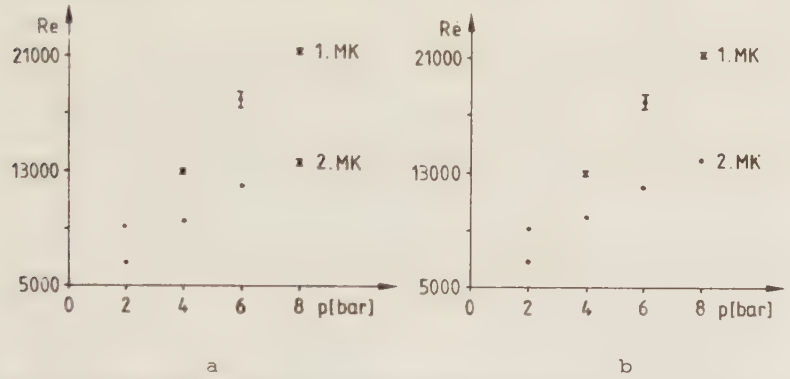


Abb.14:Abhängigkeit der Reynold'schen Zahl bei verschiedenen Drücken hinter beiden Mischkammern bei Anwendung der DSF-Methode (a) und der DSFV-Methode (b)

Zur Überprüfung der Größenordnung des Strömungswiderstandes der Mischkammer bei verschiedenen Drücken wurde die prozentuale Abnahme des Volumenstromes gemessen.

Aus Abb.15 geht hervor, daß sich die prozentuale Abnahme des Volumenstromes in einem Druckbereich von 2 - 9 bar näherungsweise linear verhält. Der Strömungswiderstand ist somit in diesem Bereich nahezu unabhängig vom Druck.

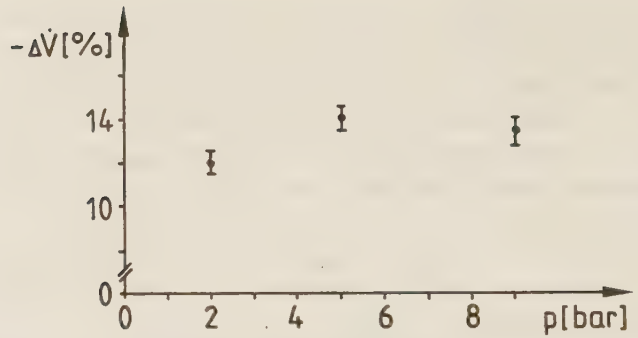
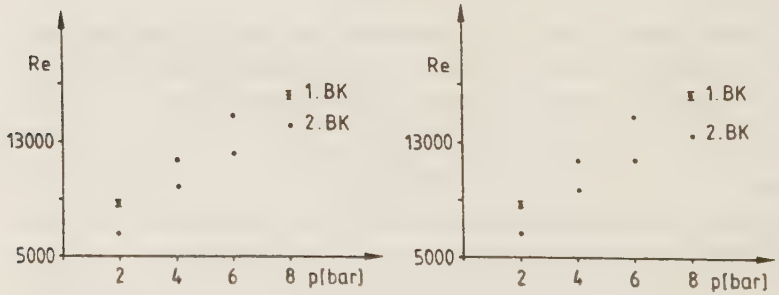


Abb.15:Die prozentuale Abnahme des Volumenstromes bei verschiedenen Drücken hinter einer Mischkammer

3.2.2.2. Eigenschaften der Beobachtungskammer

Die Beobachtungskammer ist ebenfalls ein großer Strömungswiderstand. Wie in der folgenden graphischen Darstellung gezeigt wird, sind die Reynold'schen Zahlen so groß, daß auch hier turbulente Strömungen vorliegen.



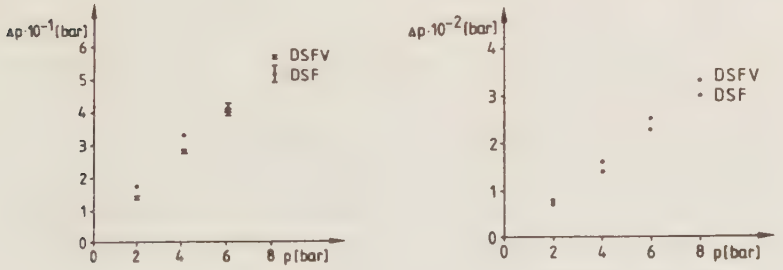
a b

Abb.16:Abhängigkeit der Reynold'schen Zahl bei verschiedenen Drücken hinter beiden Beobachtungskammern bei Anwendung der DSF-Methode (a) und der DSFV-Methode (b)

3.2.2.3. Charakterisierung verschiedener Einzelteile der Apparatur

Für eine Abschätzung des Druckverlustes im Kanülensystem wird für einige Teile mit großem Strömungswiderstand der Druckverlust berechnet.

Ein bei der Konstruktion zu beachtender Strömungswiderstand ist die 6 cm lange Kanüle zwischen dem 3-Wege-Ventil 3 und dem ersten Stopventil SV1 (siehe Abb.7) Für die Kanüle wird eine Länge von 6 cm gewählt, da einerseits ein genügend großes Lösungsvolumen für den zweiten Reaktionsschritt vorhanden sein muß und andererseits das Volumen nicht zu groß sein soll, um den Lösungsverbrauch gering zu halten. Das Innenvolumen dieser Kanüle beträgt 0.106 ml. Hinter dieser Kanüle (Innendurchmesser = 1.5 mm) verhält sich der Druckverlust Δp in Abhängigkeit vom Druck p, der auf die Lösung wirkt, wie in der folgenden Abb.17.a. Δp wird mit den Glg.(4) und (6) berechnet.



a b

Abb.17:Abhängigkeit des Druckverlustes vom auf die Lösung wirkenden Druck. a - 6 cm lange Kanüle, b - Krümmer hinter dem 3-Wege-Hahn

Für den Krümmer hinter dem 3-Wege-Hahn ergibt sich bei Annahme einer Widerstandszahl von $\zeta_{33}o$ = 0.08 /25/ das in Abb.17.b dargestellte Bild. Δp wird mit Glg.(7) berechnet.

In den Abb.17.a und 17.b verhalten sich die Druckverluste in Abhängigkeit vom Druck annähernd linear.

Einen nicht geringen Beitrag zu den gesamten Strömungsverlusten liefern die mechanischen Ventile. Jede Übergangsstelle Kanüle/Ventil verursacht Druckverluste. Für die 2-Wege-Ventile wird eine Widerstandszahl mit dem Wert 0.4 angenommen /26/. Größere Verluste treten am 3-Wege-Ventil auf. Zu der Widerstandszahl ζ = 0.4 muß noch eine Widerstandszahl für ein Knie mit einem Winkel von 90° addiert werden /27/. Es resultiert somit: ζ = 1.53. In Abb.18 sind die Druckverluste, die von den Ventilen verursacht werden, in Abhängigkeit vom Druck dargestellt.

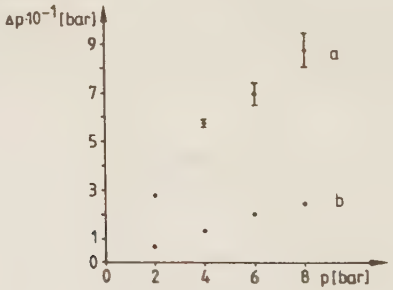


Abb.18:Abhängigkeit der Druckverluste am 3-Wege-Ventil (a) und am 2-Wege-Ventil (b) vom auf die Lösungen wirkenden Druck.

3.2.2.4. Strömungstechnische Charakterisierung der gesamten Apparatur

Das Kanülensystem wird stufenweise aufgebaut, um an verschiedenen Positionen des Systems den Volumenstrom zu messen. Die ersten Messungen werden hinter den Ventilen 1 und 2 (siehe Abb.7) durchgeführt. Der Volumenstrom wird bei verschiedenen Kammerdrücken gemessen. Die Messungen werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Mit den aus V berechneten Werten für die Strömungsgeschwindigkeiten und den Reynold'schen Zahlen wird gezeigt, daß in allen Teilen des Kanülensystems turbulente Strömungsverhältnisse vorliegen. Die Reynold'schen Zahlen hinter verschiedenen Abschnitten des Kanülensystems werden für die DSF-Methode bei Drücken von 2 bar und 6 bar in Abb.19 dargestellt.

Der maximale prozentuale Fehler der Reynold'schen Zahlen beträgt hier 10%. Wie in Abb.19 zu sehen ist, entstehen die größten Strömungsverluste hinter dem ersten Mischkammer/Beobachtungskammer-Block. Nach dem ersten Stopventil SV1 bis zum Ende des Kanülensystems ist die Turbulenz annähernd gleich. Bei einem Druck von 6 bar reduziert sich die Strömungsgeschwindigkeit von 11.5 m/s vor der ersten Mischkammer auf ungefähr 9.0 m/s hinter dieser Mischkammer. Die Strömungsgeschwindigkeit hinter dem ersten Stopventil SV1 bis zum zweiten Stopventil SV2 verringert sich um etwa 1.7 m/s.

Eine Abschätzung des Druckverlustes für das gesamte Kanülensystem ergibt bei Berücksichtigung der oben beschriebenen Strömungsverluste für einen Anfangsdruck von

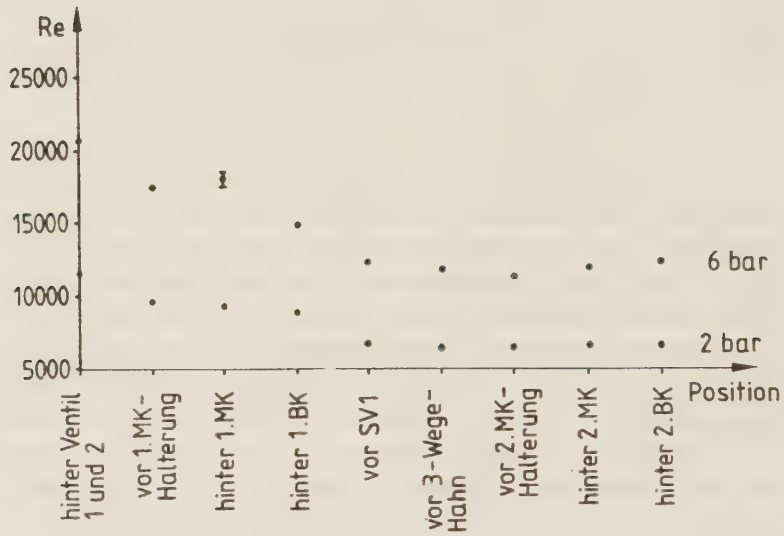


Abb.19:Die Reynold'schen Zahlen an verschiedenen Positionen des Kanülensystems für die Drücke 2 bar und 6 bar

6 bar etwa 3 bar für die DSF-Methode.

3.2.2.5. Die Bestimmung der Totzeiten

Das Reaktionsgemisch braucht eine bestimmte Zeit, um von der Mischkammer zur Beobachtungskammer zu fließen. Während dieser Zeit kann die Reaktion nicht beobachtet werden. Diese Zeit, die für die zeitliche Auflösung der Apparatur bestimmend ist, wird die Totzeit genannt. Sie ist wie folgt definiert:

$$t_T = \frac{s}{v} \qquad (17)$$

s ist die Strecke von der Mischkammer zur Beobachtungskammer und v die Geschwindigkeit des Reaktionsgemisches.

t_T[msec] / p[bar]	1.MK	2.MK	
		DSF	DSFV
2	4.1	5.9	5.8
4	3.0	4.0	3.9
6	2.2	3.3	3.2
8	1.9	2.9	2.9

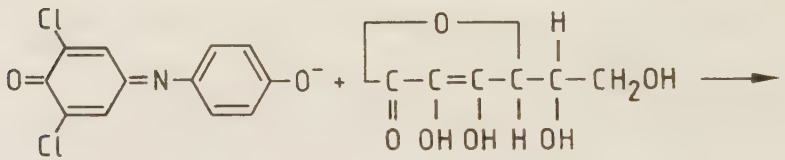
Tab.II:Berechnete Totzeiten

Nimmt man als Grundlage für die Berechnung von Totzeiten die gemessenen Volumenströme (siehe Abschn.3.2.2.1. und 3.2.2.2.) und die Strömungsquerschnitte der Misch- und Beobachtungskammern, so erhält man für verschiedene Drücke die in Tab.II angegebenen Werte.

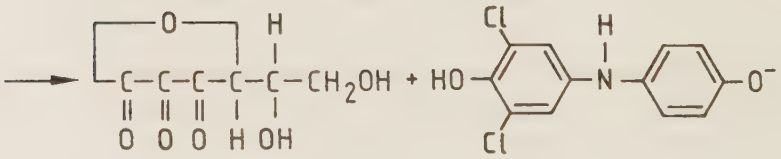
Die berechneten Totzeiten bilden eine gute Grundlage für eine Abschätzung. Da die Widerstandszahlen der Misch- und Beobachtungskammern nicht bekannt sind, kann der Strömungswiderstand bei diesen Berechnungen nicht berücksichtigt

werden. Aus diesem Grunde müssen die wahren Totzeiten für verschiedene Drücke an beiden Misch- und Detektionsstufen experimentell ermittelt werden.

Für diesen experimentellen Test wird die Reduktion von $5 \cdot 10^{-5}$ M 2,6-Dichlorindophenol mit 10 mM, 25 mM und 50 mM L-Ascorbinsäure in 0.1 M Phosphatpuffer bei pH 7.0 ausgewählt.



(V)



Die 2,6-Dichloroindophenollösung ist blau. Das Reaktionsprodukt ist farblos. Diese Farbänderung läßt sich bequem bei 580 nm verfolgen. Die Reaktion ist eine Reaktion erster Ordnung. Die folgende Abb.20 ist ein Beispiel einer Stopped flow-Messung für die oben angegebene Reaktion

Verändert man die Ausgangskonzentration der L -Ascorbinsäure, so läuft die Reaktion in verschiedenen Zeitbereichen ab. In Abb.21 wird die Extinktion in Abhängigkeit von der Reaktionszeit halblogarithmisch für die oben

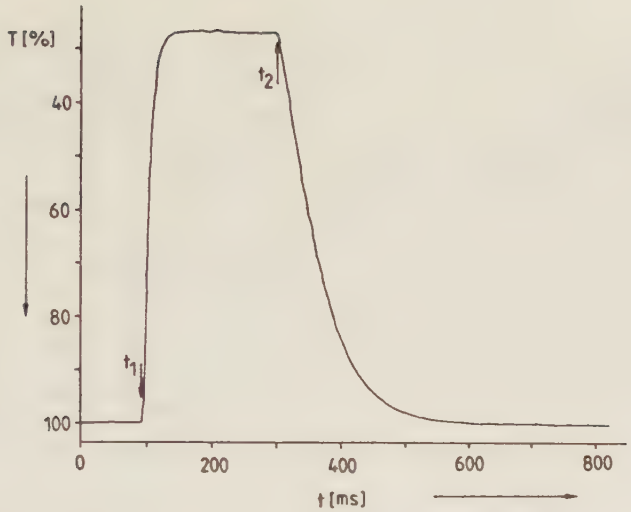


Abb.20: Stopped flow-Messung. Mischung von $5 \cdot 10^{-5}$ M 2,6-Dichloroindophenol mit 50 mM Ascorbinsäure bei Anwendung der DSF-Methode. Detektion der Transmission an der ersten Beobachtungskammer. t_1 = Startzeitpunkt, t_2 = Stopzeitpunkt, λ = 580nm, pH 7.0, p = 6bar, T = 25°C

angegebenen Bedingungen dargestellt.

Durch lineare Regression werden die Steigungen der Geraden bestimmt. Die Geraden werden dann vom ersten Zeitpunkt der Beobachtung t_B zum Zeitpunkt $t_A = 0$ für die Reaktion extrapoliert. Der zeitliche Abstand des sich daraus ergebenen gemeinsamen Schnittpunktes vom Zeitpunkt t_B entspricht der Totzeit t_T. Die experimentell bestimmten Totzeiten für beide Misch- und Detektionsstufen und die anwendbaren Meßmethoden sind in Tab.III angegeben. Die

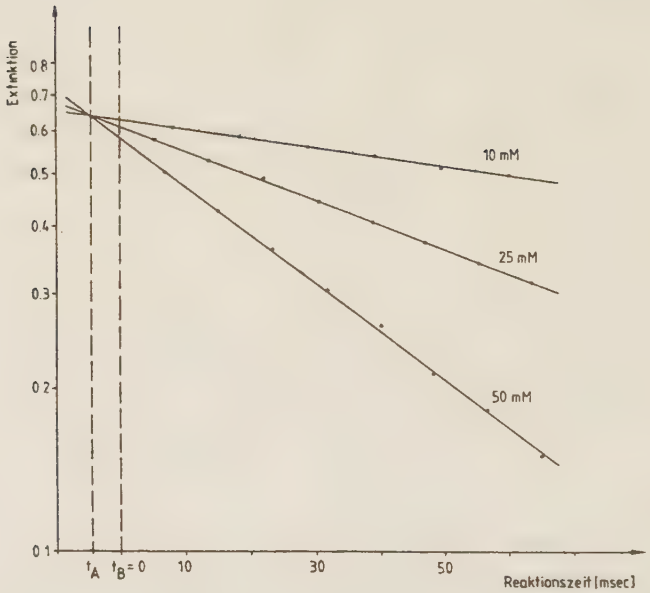


Abb.21:Halblogarithmische Darstellung der Abhängigkeit der Extinktion bei 580 nm von der Reaktionszeit zur Bestimmung der Totzeit der Apparatur mit dem Reaktionssystem 2,6-Dichlorindophenol ($5 \cdot 10^{-5}$M) und L-Ascorbinsäure in Phosphatpuffer mit pH 7.0, DSF-Methode, 1. Beobachtungskammer, T = 25°C, p = 6bar

maximale prozentuale Abweichng der in der Tabelle angegebenen Totzeiten liegt zwischen 20 und 30%. Die Diskussion dieser Meßergebnisse wird in Abschn.3.5. durchgeführt.

t_T[msec] / p[bar]	DSFV 1.MK	DSFV 2.MK	DSF 1.MK	DSF 2.MK	ESF 1.MK
2	12.1	12.0	10.0	7.2	11.2
4	8.0	9.3	6.3	4.7	5.5
6	5.4	4.8	4.5	5.4	4.3
8	7.1	3.7	6.0	5.0	4.9

Tab.III:Die experimentell bestimmten Totzeiten

3.2.2.6. Die Bestimmung der Alterungszeiten

Die zeitliche Auflösung der Doppel-Stopped flow-Methode wird durch die Zeit bestimmt, die das Reaktionsgemisch braucht, um von der ersten Mischkammer zur zweiten Mischkammer zu fließen (vgl. Abb.7). Die Zusammensetzung dieser Zeit geht aus Glg.(18) hervor.

$$t_A = t_{T1} + t_{1.BK/K} + t_{SV2} + t_K + t_V + t_{K/2.MK} \qquad (18)$$

Hier bedeuten: t_{T1} = Totzeit für die erste Misch- und Beobachtungskammer

$t_{1.BK/K}$ = Die Flußzeit der Lösung, um von der ersten Beobachtungskammer zur 6 cm langen Kanüle zu gelangen. Die Kanüle befindet sich zwischen dem 3-Wege-Ventil und

dem ersten Stopventil SV1 (vgl. Abb.7).

t_{SV2} = Öffnungszeit des zweiten Stopventils

t_K = Flußzeit in der 6 cm langen Kanüle

t_V = einstellbare Verzögerungszeit

$t_{K/2.MK}$ = Die Flußzeit der Lösung, um von der 6 cm langen Kanüle zur zweiten Mischkammer zu gelangen

Glg.(18) gilt für die DSFV-Methode. Für die DSF-Methode sind t_{SV2} und die Verzögerungszeit $t_V = 0$. Es gilt dann:

$$t_A = t_{T1} + t_{1.BK/K} + t_K + t_{K/2.MK} \qquad (19)$$

Zur Messung der Alterungszeiten wird ebenfalls die im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Reaktion angewandt. Das Reaktionsgemisch wird durch das gesamte Kanülensystem gedrückt, nach einer bestimmten Flußzeit gestoppt und gleichzeitig an beiden Detektionsstufen beobachtet.

Aufgrund des unterschiedlichen Alters der Reaktionsgemische an beiden Detektionsstufen, entspricht die beobachtete Anfangsamplitude am zweiten Detektionskanal nicht der der am ersten Detektionskanal. Überlagert man beide Kurven, so erhält man durch Vergleich die Zeit, die die Lösung braucht, um von der ersten Beobachtungskammer zur zweiten zu gelangen. Addiert man die erste Totzeit zu dieser Zeit, subtrahiert die zweite Totzeit,so ergibt sich daraus die Alterungszeit für die DSF-Methode. Zur Bestimmung der

t_A[msec] / p[bar]	DSF	DSFV
2	45.6	33.9
4	26.1	———
6	21.8	———
8	23.8	———

Tab.IV: Die Alterungszeiten bei der DSF- und DSFV-Methode und verschiedenen Drücken

Alterungszeit bei Anwendung der DSFV-Methode wird ähnlich verfahren. Das Reaktionsgemisch wird jedoch mit dem ersten Stopventil abgestoppt, nach Ablauf einer vor der Messung eingestellten Verzögerungszeit in die zweite Mischkammer gedrückt, mit dem zweiten Stopventil gestoppt und am zweiten Detektionskanal beobachtet, so daß in dieser Alterungszeit außerdem noch die Verzögerungszeit und die Öffnungszeit enthalten sind. Die Größe der Alterungszeiten werden in Tab.IV angegeben und in Abschn.3.5. diskutiert.

Mit der DSFV-Methode kann nur bei 2 bar ein Meßsignal registriert werden, da bei höheren Drücken die Flußgeschwindigkeit der Lösung größer ist als die Schließgeschwindigkeit des zweiten mechanischen Stopventils.

3.3. Optik

Die verwendeten optischen Einheiten setzen sich aus einer Strahlungsquelle, einem Monochromator, einem Linsensystem und einer Detektionseinheit zusammen (siehe Abb.6). In den folgenden Abschnitten werden die verschiedenen Komponenten der optischen Einheit beschrieben.

3.3.1. Die Lampen

Es stehen drei Lampen für einen Wellenlängenbereich von 200 - 800 nm zur Verfügung. Eine 150 W-Xenon-Lampe (Canrad Hanovia) und eine 200 W-Quecksilber/Xenon-Lampe (Canrad Hanovia) werden für den UV-Bereich und eine Wolframlampe (Osram) für den sichtbaren Wellenlängenbereich des Spektrums benutzt. Die Lampen sind in Gehäusen mit mechanischen Justiereinrichtungen, die am MPI für biophysikalische Chemie in Göttingen konstruiert wurden, montiert. Mit einer Gleichspannungsquelle (NGB 32 von der Firma Rhode & Schwarz) werden die Lampen versorgt. Dieses Gerät kann als Konstant-Spannungs- wie auch als Konstant-Stromgerät eingesetzt werden. Die Abweichung der Ausgangsspannung des Gerätes beträgt bei Lastschwankung 0.01%. Die Ausregelzeit ist kleiner als 50 µs. Die Xenon- und Quecksilber/Xenon-Lampen werden mit einem Zündgerät (Siemens, Typ SNZ 4057) gezündet. Die Betriebsspannungen und -stromstärken werden im folgenden aufgeführt:

Xe-Lampe : 7.5 A, 20 V
Hg/Xe-Lampe : 8 - 9.5 A, 21 - 25 V
Wolframlampe : 8 A, 11 V

3.3.2. Die Monochromatoren

Die Lichtquelle wird mit einer Kondensorlinse auf den Eintrittsspalt des Monochromators (AMKO, Typ METROSPEC) abgebildet. Die Spalte am Monochromator sind verstellbar. Der Monochromator ist ein Gittermonochromator mit einer symmetrischen Czerny-Turner-Aufstellung seiner optischen Elemente. Das Gitter hat 1200 Linien/mm. Die reziproke lineare Dispersion ist in der Vorwärtsrichtung nahezu konstant und beträgt 4 nm/mm. Bei einer Wellenlängengenauigkeit von 1 nm kann in einem Spektralbereich von 200 - 800 nm gemessen werden. Im Abstand von zwei Bandbreiten ist das Streulicht bei diesem Monochromator geringer als 0.02%, wenn mit 365 nm eingestrahlt wird.

Für genaue Fluoreszenzmessungen ist es erforderlich, Streulicht zu reduzieren und bestimmte Wellenlängenbereiche zu isolieren. Es ist deshalb für diese Messungen die Möglichkeit geschaffen worden, einen Filter zwischen der Beobachtungskammer und dem Fluoreszenz-Photomultiplier zu installieren. Bei großen Fluoreszenzintensitäten kann anstatt des Filters ein kleiner Monochromator (Schoeffel, Typ GM 100) eingesetzt werden.

3.3.3. Das Linsensystem

Die Linsen (Spindler & Hoyer) bestehen aus einem UV - durchlässigem Quarzglas (Spectrosil B), das in einem Wellenlängenbereich von 200 - 1000 nm einsetzbar ist. Das aus dem Monochromator tretende Lichtbündel wird mit einer plankonvexen Linse (f = 140 mm) gebündelt und tritt danach

durch einen Strahlenteiler, der eine Dicke von 0.7 mm hat. Etwa 10% der Lichtintensität werden über eine plankonvexe Linse (f = 140 mm) auf die photosensitive Schicht des Photomultipliers gelenkt. Der größere Teil der Lichtintensität (ca. 90%) wird ebenfalls über eine plankonvexe Linse (f = 140 mm) auf die Mitte der Beobachtungskammer fokussiert. Das aus der Beobachtungskammer kommende Lichtbündel wird dann über eine bikonvexe Linse (f = 50 mm) auf den Photomultiplier für Absorptionsmessungen gerichtet.

3.3.4. Die Photomultiplier

Für die Detektion der Referenz- und Meßsignale der Transmissions- bzw. Absorptionsmessungen werden selektierte Photomultiplier (geringer Dunkelstrom) von EMI (Typ 9781B) gewählt. Die typische Kathoden-Anoden-Spannung dieser Photomultiplier beträgt 670 Volt (maximal 800 Volt). Die Detektion des Fluoreszenzlichtes wird mit dem Photomultipliertyp 9558QB (EMI) verwirklicht. Die Kathoden-Anoden-Spannung ist hier typisch 1100 Volt (maximal 1800 Volt). Beide Photomultipliertypen sind für den UV-Bereich und den sichtbaren Wellenlängenbereich einsetzbar. Die Meßsignale der Photomultiplier werden mit einer Operationsverstärkerschaltung verstärkt und in einem Steuer- und Kontrollpult elektronisch weiterverarbeitet (siehe Abschn.3.4.2.)

3.3.5 Spektrale Eigenschaften der Apparatur

3.3.5.1. Absorptionsmessung

Ein Test der Apparatur ist die Messung der Amplituden

bei verschiedenen Wellenlängen an beiden Detektionsstufen. Die Extinktionen einer $5 \cdot 10^{-5}$M 2,6-Dichlorindophenollösung werden im sichtbaren Spektralbereich mit einer Wolframlampe und im UV-Bereich mit einer Hg/Xe-Lampe durchgeführt. Als Vergleich dient das mit einem HP8450 A UV/VIS-Spectrophotometer (Hewlett Packard) gemessene Absorptionsspektrum derselben Lösung. Wie in Abb.21 zu sehen ist, wird das Spektrum in Bereich von 250 - 550 nm gut wiedergegeben. Oberhalb 550 nm gibt es aufgrund der begrenzten Empfindlichkeit des verwendeten Photomultipliers größere Abweichungen. In dem Wellenlängenbereich von 250 - 550 nm beträgt die Abweichung maximal 10%. Die Reproduzierbarkeit der Absorptionsmessungen ist besser als 99%.

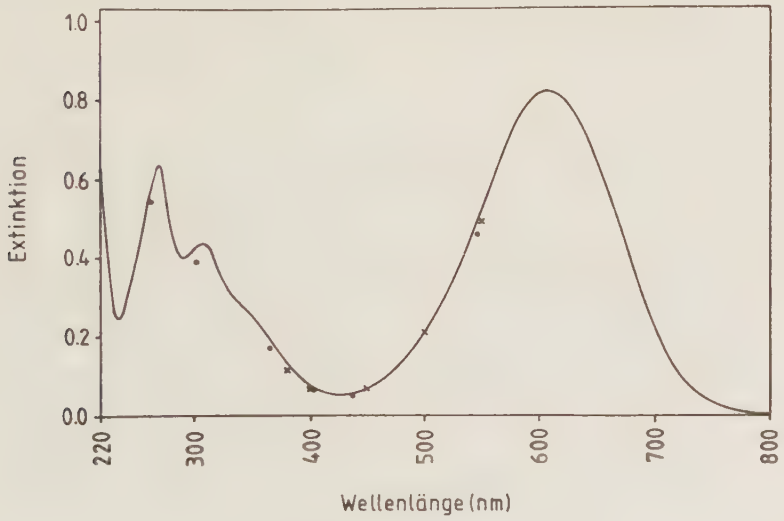


Abb.22: Vergleich der Amplituden einer $5 \cdot 10^{-5}$M Dichlorindophenollösung, gemessen mit der Drei-Komponenten-Stopped flow-Apparatur und dem HP-Spectrophotometer, bei verschiedenen Wellenlängen mit der ersten Detektionsstufe. × Wolframlampe, • Hg/Xe-Lampe

Außer der Bestimmung der Amplitudenbeträge ist für eine exakte Messung die Überprüfung der Linearität der Extinktionen bei einer Wellenlänge erforderlich. Als Testlösungen dienten 2,6-Dichlorindophenollösungen verschiedener Konzentrationen: 10^{-4}M, $5 \cdot 10^{-5}$M, $2.5 \cdot 10^{-5}$M, 10^{-5}M, 10^{-6}M. Der Vergleich zwischen den am HP-Spectrophotometer gemessenen Extinktionen E mit den mit der Drei-Komponenten-Stopped flow - Apparatur registrierten Transmissionssignalen wird in Abb.23 dargestellt.

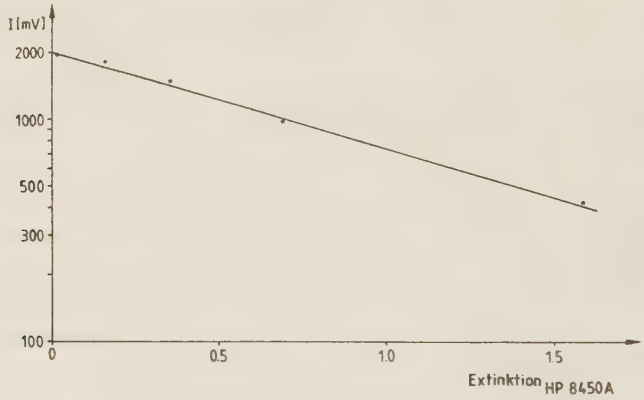


Abb.23: Halblogarithmische Darstellung der mit der Drei-Komponenten-Stopped flow - Apparatur gemessenen Transmissionssignale bei 580 nm gegenüber den am HP-Photometer gemessenen Extinktionen bei 580 nm verschiedener Konzentrationen von 2,6-Dichlorindophenollösungen in Phosphatpuffer (pH 7.0) bei T = 25°C. Die Konzentrationen dieser Lösungen betragen: 10^{-4}M, $5 \cdot 10^{-5}$M, $2.5 \cdot 10^{-5}$M, 10^{-5}M, 10^{-6}M.

Der Zusammenhang zwischen den gemessenen Transmis-

sionssignalen und der Extinktion wird durch die folgende Gleichung ausgedrückt:

$$I = I_o \cdot 10^{-E} \qquad (20)$$

I_o ist die Intensität des Meßsignals für E = 0 und I die Intensität des Meßsignals für E > 0. Die obige Abb.23 zeigt, das der Zusammenhang zwischen den in der obigen Glg.(20) dargestellten physikalischen Größen E und I in einer halblogarithmischen Darstellung linear ist. Das Signal/Rausch - Verhältnis hat für eine Extinktion von 1.5 einen Betrag von 361.0 und für eine Extinktion von 0.01 einen Betrag von 17.0.

3.3.5.2. Fluoreszenzmessung

Senkrecht zu den Absorptionsdetektionseinheiten gibt es die Möglichkeit, gleichzeitig Fluoreszenzeigenschaften der Lösungen zeitabhängig zu detektieren. Als Reaktionspartner einer Testreaktion werden $5 \cdot 10^{-7}$M Albumin aus Rinderserum und $5 \cdot 10^{-8}$M des Farbstoffes 8-Anilino-naphthalin-1-sulfonsäure Ammoniumsalz (ANS-NH_4) genommen. ANS-NH_4 fluoresziert in Verbindung mit dem Albumin. Das Verhältnis von Signal zu Rauschen der mit Stopped flow-Messungen erhaltenen Reaktionskurve beträgt hier 6.7.

3.4. Elektronische Steuerungen, Messwerterfassung und Datenübertragung

3.4.1. Die Steuerungsschaltung der Ventile

Die Verwendung der Ventile (siehe Abschn.3.2.1.2.) erfordern eine elektronische Steuerung, die das Schalten der Ventile in einer bestimmten Zeitfolge gewährleistet. Für die Realisierung stehen prinzipiell zwei Methoden zur Wahl. Eine mögliche Lösung ist die Anwendung eines Mikroprozessors mit einer dem Problem entsprechenden Programmierung. Das logische Verschalten elektronischer Bausteine ist eine andere mögliche Steuerungsmethode. Da der Aufwand gemessen an der Anwendung und den Kosten bei der letzteren Methode in einem besseren Verhältnis stehen, wird dieser Weg gewählt.

Die logischen Schaltungen werden auf Leiterplatten realisiert und verdrahtet. Die Verbindungen der elektronischen Bausteine werden kurz gewählt, so daß eine geringe Empfindlichkeit gegenüber Störsignalen von elektrischen und magnetischen Feldern besteht. Die Leitungen sind kürzer als 25 cm. Die Fehlerrate pro verwendeten Baustein wird von der Herstellerfirma (Texas Instruments) mit 0.01% angegeben.

Die hier entwickelte Ventilsteuereinheit besteht aus einer 5 Volt-Spannungsversorgung für die elektronischen Bausteine, einer 12 Volt-Spannungsversorgung für die elektromagnetischen Ventile sowie 8 Leiterplatten für den Schaltungsaufbau. Auf den Leiterplatten werden Ventilsteuerungsmöglichkeiten für alle drei Stopped flow-Methoden (vgl. Abschn.3.1.) und eine Clear-Funktion verwirklicht. Die Clear-Funktion muß vor jeder Messung benutzt werden, um

alle zeitabhängigen elektronischen Bausteine in den Anfangszustand zurückzusetzen. Mit der Kenntnis der Schaltzeiten der Ventile (siehe Abschn.3.2.1.2.) können die Öffnungszeiten und die Verzögerungszeiten der Ventile zueinander an den elektronischen Bausteinen eingestellt werden. Elektronisch wird das mit zwei hintereinandergeschalteten Monoflops realisiert. Die Einstellung der Zeiten erfolgt über ein RC-Glied. Das Monoflop hat die Eigenschaft, nach Ablauf eines Impulses nicht sofort in den Ruhezustand zurückzukippen, sondern erst nach Ablauf der durch das RC-Glied vorgegebenen Zeit. Der maximale zeitliche Fehler dieses Bausteins beträgt 0.5% vom Endwert.

Der Schaltplan für die Ventilsteuereinheit ist dem Anhang beigelegt. Im folgenden werden die elektronischen Schaltungen für die verschiedenen Meßmethoden dargestellt.

a)Doppel-Stopped flow-Methode mit variabel einstellbarer Verzögerungszeit (DSFV):

Der erste Schritt dieser Meßmethode wird mit dem Öffnen der Ventile 1 und 2 hinter den Reservoirs A und B sowie der Stopventile SV1 und SV2 (vgl. Abb.7) eingeleitet. Da die Ventile zum Schalten 12 Volt Gleichspannung benötigen, werden die Ventile mit einer Leistungsstufe angesteuert. Die Flußzeit, die extern eingestellt werden kann, wird von einem Zeitverzögerungsbaustein (NE 555), wie er in Abb.24 gezeigt wird, bestimmt.

Die Impulslänge wird hier ebenfalls über ein RC-Glied variiert. Nach Ablauf der Flußzeit werden die Ventile gleichzeitig geschlossen.

Mit dem Auslösen des ersten Schrittes wird ein digi-

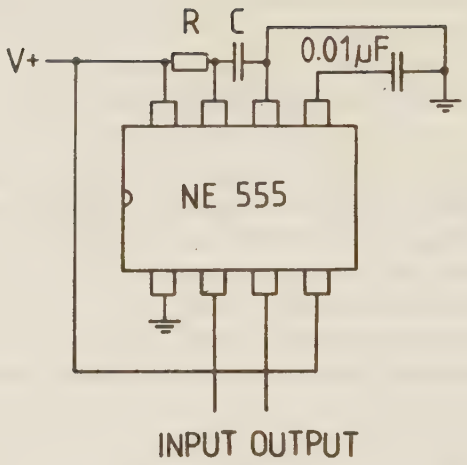


Abb.24:Schaltbild des NE 555 (monostabile Kippstufe)

tales Speichoszilloskop (Nicolet) getriggert, so daß der gesamte Meßprozess einschließlich der Flußzeit beobachtet werden kann. Durch Anwendung einer Triggerverzögerungsschaltung ist es möglich, Messungen in kleinen Zeitbereichen im Speicheroszilloskop festzuhalten.

Nach Ablauf des ersten Schrittes wird durch einen Rückmeldeimpuls ein Schrittzähler um Eins erhöht und der zweite Schritt eingeleitet. Der Impuls geht nun zu einem BCD-Decoder und einem Decoder/Treiber für eine Sieben-Segment-Anzeige (Schrittanzeige). Der BCD-Decoder setzt eine im BCD-Code dargestellte Zahl in den 1 - aus 10 - Code um. Im zweiten Schritt wird die Verzögerungszeit (5 ms - 200 s), während der der Ablauf der Reaktion an der ersten Detektionsstufe beobachtet werden kann, geschaltet. Anschließend wird über den Schrittzähler und dem BCD-Decoder

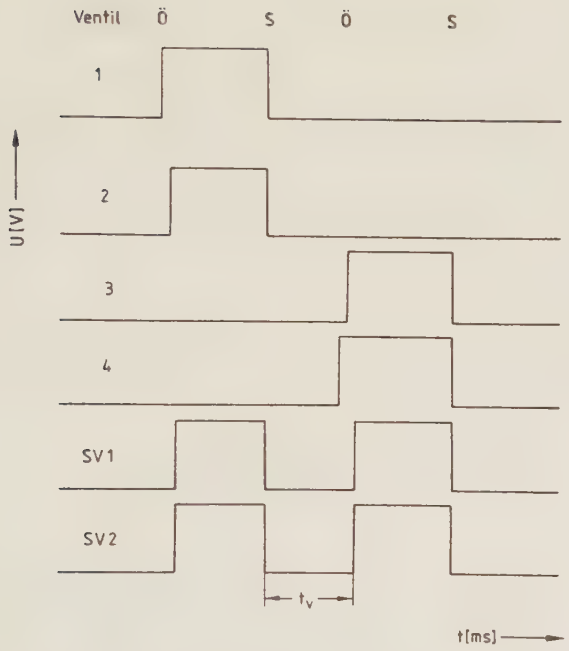


Abb.25: Spannungsimpulsschema der Ventile für die DSFV-Methode (vgl. Abb.7). Abkürzungen: Ö = Öffnungszeit, S = Schließzeit, t_V = Verzögerungszeit. t_{GES} = 1023.5 ms, Amplitude/Impuls = 11.5 V.

automatisch der dritte Schritt eingeleitet. Das heißt: Die Ventile 3, 4, SV1 und SV2 werden geöffnet. Nach Ablauf der Flußzeit und der Schaltzeit der Ventile kann an der zweiten Detektionsstufe die zweite Reaktion beobachtet werden. Die Reihenfolge des Schaltens der Ventile wird anhand eines

Impulsschemas in Abb.25 verdeutlicht.

b)Doppel-Stopped flow-Methode ohne Verzögerungszeit (DSF):

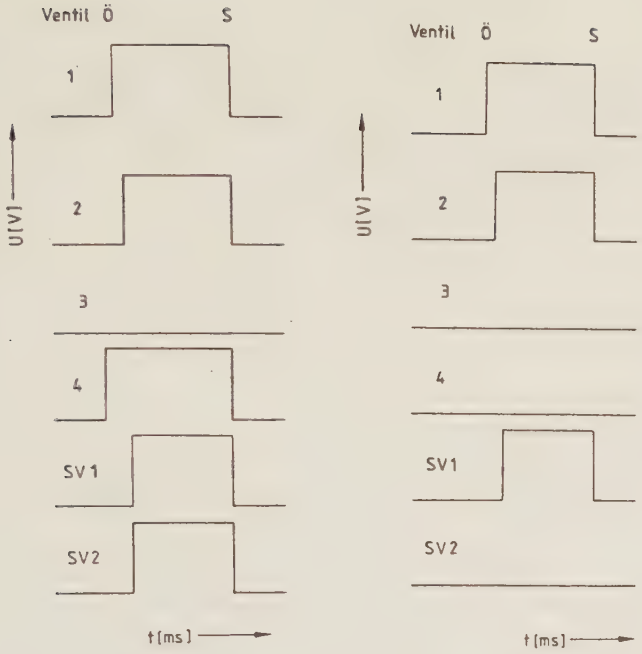
Durch Hinzufügen einer relativ kleinen Anzahl elektronischer Bauteile ist die Schaltung für die DSF-Methode verwirklicht worden. Schrittzähler und BCD-Decoder müssen hier nicht eingesetzt werden. Die Ventile 1, 2, SV1, SV2 und 4 werden lediglich einmal geöffnet und geschlossen. Die Flußzeit wird mit der zweiten Flußzeitregelung der DSFV-Methode eingestellt.

Die Registrierung der Reaktionsverläufe findet an beiden Detektionsstufen gleichzeitig statt. Die Schaltfolge für die Ventile geht aus Abb.26.a hervor.

c)Einfach - Stopped flow - Methode (ESF):

Die Schaltung für diese Methode wurde auf einer separaten Leiterplatte verdrahtet. Die Methode funktioniert prinzipiell wie die oben beschriebenen Methoden. Es werden nur die Ventile 1, 2 und SV1 einmal betätigt (siehe Abb.26.b) und die Reaktion an der ersten Detektionsstufe beobachtet.

Zusätzlich können alle Ventile mit Schaltern geöffnet und geschlossen werden. Diese Schaltmöglichkeit erleichert das Säubern der Reservoirs, des Kanülensystems und der Ventile.



(a) (b)

Abb.26: Spannungsimpulsschema der Ventile für die DSF-Methode (a) und die ESF-Methode (b) (vgl. Abb.7). Abkürzungen: Ö = Öffnungszeit, S = Schließzeit, t_{GES} = 465.7 ms, Amplitude/Impuls = 11.5 V.

3.4.2. Die Verstärkung der Meß- und Referenzsignale

Die Verstärkung der Signale erfolgt an zwei verschiedenen Positionen:

a) direkt am Photomultiplier im Photomultipli-

ergehäuse
b) in einem Steuer- und Kontrollpult

Grundlage der Verstärkerschaltungen ist die Operationsverstärkertechnik. Die Operationsverstärker werden als invertierende und nichtinvertierende Verstärker eingesetzt. Der invertierende Operationsverstärker arbeitet für Verstärkungen größer als Eins linear und der nichtinvertierende nur für einen Verstärkungsfaktor Eins.

Für die verschiedenen Verstärkungseinheiten werden die Eigenschaften der Operationsverstärker LM 356, µA 709, µA 741 und µA 747 genutzt.

Direkt hinter dem Photomultiplier wird das Signal von einem invertierenden Operationsverstärker µA 709 linear verstärkt. Die gesamte Schaltung im Photomultipliergehäuse ist mit verschiedenen Widerständen und Kondensatoren für die Meßaufgaben dimensioniert worden. Näheres ist im Schaltplan (siehe Anhang) ersichtlich. Das so verstärkte Signal wird in das Steuer- und Kontrollpult geführt. In diesem Pult kann das Signal in mehreren Stufen nachverstärkt werden. Vor der erstmaligen Benutzung des Steuer- und Kontrollpultes mußten alle Verstärkerstufen auf 0 mV (Basislinie) abgeglichen werden. Das in das Pult ankommende Signal kann zuerst um einen Faktor Eins oder Fünf verstärkt werden. Die Abweichungen von einem Einstellwert sind bei einer Verstärkung um Faktor Eins von 100 mV - 5000 mV kleiner als 1%, bei 100 mV beträgt die Abweichung ungefähr 2%. Bei einer Verstärkung um Faktor 5 liegen die Abweichungen unterhalb 1%.

Nach dieser ersten, festen Verstärkungsstufe kann das Signal nochmals mit einer variabel einstellbaren Verstärker-

stufe vergrößert oder verkleinert werden, um das Meßsignal an das Referenzsignal anzugleichen. Anschließend wird die Differenz zwischen Meß- und Referenzsignal gebildet. Die Signaldifferenz driftet während einer 30-minütigen Meßzeit um etwa 1 mV. Zwischen der Stufe für den Risetimefilter und der Spannungskompensation ist ein Impedanzwandler eingebaut worden, um eine optimale Anpassung zwischen diesen beiden Stufen zu erreichen. Die Abweichung von einem Einstellwert beträgt bei der Spannungskompensation für 100 mV - 5500 mV weniger als 0.1%. Das Rauschsignal am Ausgang des Steuer- und Kontrollpultes hat für eine Frequenz von größer als 100 kHz eine Amplitude von etwa 5 mV. Die Schaltpläne für das Steuer- und Kontrollpult sind dem Anhang beigelegt.

3.4.3. Die Datenregistrierung, -übertragung und -auswertung

Die experimentellen Daten werden von einem digitalen 12 bit-Speicheroszilloskop registriert. Die Registrierung kann auf direktem Wege vom Steuer- und Kontrollpult aus, über eine Doppelzeitbasis (SEM) oder einen Vier-Kanal-Multiplexer (SEM) erfolgen. Im ersten Fall wird das Speicheroszilloskop vom Ventilsteuerungsgerät, in den anderen Fällen von der Doppelzeitbasis bzw. dem Vier-Kanal-Multiplexer getriggert.

Die Doppelzeitbasis ermöglicht die Registrierung der Reaktionsverläufe an beiden Detektionsstufen nacheinander in zwei verschiedenen Zeitbereichen auf einem Kanal des Speicheroszilloskops. Mit Hilfe des Vier-Kanal-Multiplexers kann man vier Meßsignale übertragen. Da mit dem

Speicheroszilloskop nur zwei Kanäle zur Verfügung stehen, kann man so die Anzahl der gleichzeitigen Messungen auf vier erhöhen, indem ein Kanal halbiert wird. Für die Auswertung müssen jedoch die Meßsignale demultiplext werden. Dieses Gerät erlaubt die gleichzeitige Registrierung von Fluoreszenz - und Absorptionsdaten an beiden Detektionsstufen.

Alle Daten können auf einer Diskette abgespeichert werden. Das Diskettenlaufwerk ist im Oszilloskop eingebaut. Die auf der Diskette abgespeicherten Meßdaten können mit Hilfe des digitalen Speicheroszilloskops über ein spezielles Interface auf einen Computer (HP 1000 von Hewlett Packard) übertragen werden. Die Daten werden mit dem Programm "XPLCN" übertragen. Das Programm kreiiert auch ein Datenfile, in das alle Datenpunkte einer Messung eingelesen werden. Die Meßkurven können danach ausgwertet werden.

Für die Auswertung stehen die zwei Anpassungsprogramme "SFEXP" und "SFEX1" zur Verfügung. Grundlage für die Anpassungen ist die least-square-fit-Methode von Marquardt /28/ und sind die Glg.(16) für irreversible und die Glg.(15) für reversible Reaktionsprozesse zweiter Ordnung. Beide Programme erlauben die Anpassung der Geschwindigkeitskonstanten, der Dissoziationskonstanten, der apparativen Größe t_T sowie der prozentualen Beteiligung einer Ausgangslösung am Reaktionsgemisch.

Die Geschwindigkeitskonstante für Reaktionen erster Ordnung kann mit dem Anpassungsprogramm "DISCRETE"/29/30/ bestimmt werden.

Die Anwendung der angegeben Programme wird in den Abschn.5.2.2. und 5.2.3. besprochen.

3.5 Diskussion wichtiger Eigenschaften der Drei-Komponenten-Stopped flow-Apparatur

Die in den vorangehenden Abschnitten beschriebenen Tests zeigen, daß die Drei-Komponenten-Stopped flow-Apparatur die gesetzten Ziele erfüllt. Die Apparatur kann mit allen drei Meßmethoden (DSFV, DSF, ESF) im Millisekundenbereich eingesetzt werden.

Die aufgrund der Aufgabenstellung und der Konstruktion bedingten notwendigen großen Strömungswege im mechanischen Teil der Apparatur vergrößern die Totzeit nicht wesentlich. Die minimale Totzeit im ESF-Meßmodus beträgt 4.3 ms bei einem Kammerdruck von 6 bar (vgl. Tab.III). Die Strömungsgeschwindigkeit in der Beobachtungskammer, die einen Durchmesser von 3 mm und eine Schichttiefe von 10 mm hat, beträgt bei diesem Druck 2 m/s. Durch Einbau einer Beobachtungskammer mit einer Schichttiefe von 2 mm (der Durchmesser beträgt dann ebenfalls 2 mm) könnten sich der Strömungswiderstand und der Abstand der Mitte der Beobachtungskammer von der Mischkammer verkleinern lassen, so daß dadurch die Totzeit kleiner werden würde. Für die Totzeit der DSFV-Methode an der zweiten Mischstufe ergibt sich aufgrund des kleineren Strömungsweges bei 8 bar ein geringerer Wert: 3.7 ms. Die minimalen Totzeiten bei Anwendung der anderen Meßmethoden liegen zwischen 4.8 und 5.4 ms.

Ein Vergleich mit der Einfach-Stopped flow-Apparatur der japanischen Firma Union Giken zeigt, daß die Totzeit sich bei einer Beobachtungskammer mit 10 mm Schichttiefe von der der Drei-Komponenten-Stopped flow-Apparatur nur gering unterscheidet. Die hier mit demselben Testsystem ermittelte Totzeit beträgt bei dieser Apparatur 3.3 ms.

Die Messungen sind ebenfalls bei 6 bar durchgeführt worden.

Alle Totzeiten hängen von dem auf die Lösung wirkenden Druck ab. Sie werden in einem Druckbereich von 2 - 6 bar kleiner . Bei 8 bar sind die Totzeiten etwas größer. Die Ursache für diesen experimentellen Befund liegt in der größeren Turbulenz der Flüssigkeit bzw. in den sich stärker auswirkenden Strömungswiderständen - besonders in der Mischkammer und der Beobachtungskammer. Das bedeutet, daß durch Messen mit einem Druck von 8 bar keine Verbesserung der zeitlichen Auflösung der Apparatur erzielt wird.

Die Druckverluste in der Misch- und Beobachtungskammer konnten nicht bestimmt werden, da die Widerstandszahlen für diese Teile der Apparatur nicht bekannt sind bzw. nicht abgeschätzt werden können. Der Druckverlust könnte mit speziellen piezoresistiven Druckmeßdosen und Drucktransmittern experimentell bestimmt werden. Diese Hilfsmittel stehen jedoch nicht zur Verfügung.

Die experimentelle Bestimmung der Totzeiten ist mit einem prozentualen Fehler von 20 - 30% behaftet. Kleine Differenzen zwischen den Drücken, die auf die zwei verschiedene Lösungen wirken, haben ein unterschiedliches Mischungsverhältnis der Reaktionskomponenten zur Folge, so daß sich die Anfangsamplitude von Messung zu Messung gering unterscheidet. Dieses Problem besteht vor allem an der zweiten Mischkammer, da der Kammerdruck für Lösung C über einen Druckminderer, der eine Ablesegenauigkeit von 0.1 bar hat, eingestellt wird. Der Druckminderer ist notwendig, um den Druckverlust auf der anderen Seite des Kanülensystems auszugleichen. Das erschwert die Auswertung der experimentellen Daten zur Bestimmung der Totzeiten und erhöht deren Ungenauigkeit.

Die Alterungszeiten sind aus demselben Grund mit einem Fehler von 20 - 30% behaftet. Die Alterungszeit verhält sich wie die Totzeit. Sie nimmt in einem Druckbereich von 2 - 6 bar ab und ist bei einem Druck von 8 bar gegenüber 6 bar auch geringfügig größer. Die Alterungszeit bei der DSFV-Methode ist mit 2 bar geringer als bei Anwendung der DSF-Methode, da der Strömungsweg für den zweiten Schritt der DSFV-Methode kleiner ist. Für die anderen Drücke kann diese Methode nicht angewandt werden, da die Ventile langsamer schließen als das Reaktionsgemisch fließt. Das Stopventil SV2 ist erst geschlossen, wenn das Reaktionsgemisch durch das Ventil schon hindurchgeflossen ist. Die minimalste Alterungszeit eines Reaktionsgemisches kann mit der DSF-Methode bei 6 bar erreicht werden. Sie beträgt dann 22 ms.

Bei allen Methoden kann die Strömungsgeschwindigkeit variiert werden, indem der Kammerdruck verändert wird. Es ist daher beispielsweise nicht notwendig, größere Kanülen gegen kleinere auszutauschen, um größere Strömungsgeschwindigkeiten zu erreichen. Durch Änderung des Kammerdruckes kann so die Alterungszeit variiert werden. Der Lösungsverbrauch hängt vom Kammerdruck und der Flußzeit ab. Dieser Verbrauch an Lösungen ist für die Drücke 2 und 8 bar und die Flußzeiten 50 und 100 ms experimentell bestimmt worden. Für eine Flußzeit von 50 ms beträgt der Lösungsverbrauch bei 2 bar 0.35 ml und 8 bar 0.88 ml . Der Lösungsverbrauch erhöht sich bei größeren Flußzeiten. Er beträgt für 100 ms bei 2 bar 0.55 ml und 8 bar 1.40 ml.

Die optischen Eigenschaften der Apparatur entsprechen ebenfalls den Zielvorstellungen. In einem Extinktionsbereich von 0.01 beträgt das Signal/Rausch-Verhältnis 17.0.

Es ist deshalb möglich Reaktionen in einem Extinktionsbereich von 0.001 zu beobachten. Die Fluoreszenzdetektionseigenschaften entsprechen denen der Stopped flow-Apparatur der Firma Union Giken. Das Signal/Rausch-Verhältnis ist unter denselben Bedingungen etwa gleich (siehe Abschn.3.3.5.2.).

4. Untersuchung der Protolyse und der Komplexbildungseigenschaften von Calcimycin

4.1. Calcimycin - ein Kationen-Carrier in künstlichen und biologischen Membranen

Die Untersuchungen des Transportes von Ionen - insbesondere von Ca^{++} - durch Membranen sind häufig Gegenstand biochemischer Fragestellungen. Ursache dieses Interesses ist das Ziel, die molekularen Transportmechanismen durch Membranen, die regulatorische Funktionen haben, verstehen zu lernen. Es werden daher einfache chemische Verbindungen gesucht, an denen Modellstudien vorgenommen werden können. Beispiele für solche Betrachtungen sind die Untersuchung der Eigenschaften von membrangebundenem Valinomycin, Enniatin B und Gramicidin A /13/.

Das Antibiotikum Calcimycin ist eine Verbindung, die sich für die Untersuchung des passiven Transportes von Ca^{++} und anderen divalenten Ionen besonders eignet. Das Antibiotikum bindet in selektiver Weise divalente Ionen. Alkalionen werden nur schwach gebunden. Calcimycin - der aktivste niedermolekulare Ca^{++}-Carrier - wird von vielen Forschungsgruppen verwendet, um die Mechanismen des passiven Transportes von Ca^{++} durch künstliche und biologische Membranen zu studieren.

D.R. Pfeiffer,R.W. Taylor und H.A. Lardy kommen aufgrund ihrer Studien zum Ergebnis, daß der deprotonierte, negativ geladene Zustand des Calcimycins (A^-) mit einem Ca^{++} an der Membran einen 1:1-Komplex (Calcimycin:Ca^{++}) bildet. Aus diesem Komplex entsteht in der Membran durch Bindung eines zweiten deprotonierten Calcimycins ein 2:1-Komplex.

Das Ca^{++} wird in Form des neutralen 2:1-Komplexes durch die Membran transportiert und auf der gegenüberliegenden Seite wieder entlassen. Danach kann das negativ geladene Calcimycin protoniert werden und zur anderen Seite der Membran zurückdiffundieren, um dort einen neuen Ca^{++}-komplex zu bilden, der für den Transport des nächsten Ca^{++} verantwortlich ist /31/. Der hier entwickelten Modellvorstellung, die in Abb.27 dargestellt wird, liegt ein zyklischer Reaktionsprozess zugrunde.

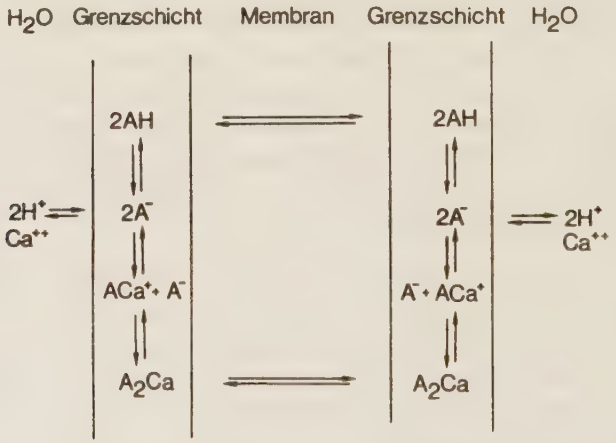


Abb.27: Modell für den Transport von Ca^{++} durch Membranen mittels Calcimycin

Diese Vorstellung wird durch Leitfähigkeitsmessungen an schwarzen Membranen (Müller-Rudin-Membranen) bestätigt/32/33/. Die Leitfähigkeit der Membran wird in Gegenwart von Calcimycin durch Zugabe von Ca^{++} nicht erhöht. Diese Untersuchungen weisen auf einen elektroneutralen Transport von Ca^{++} hin.

Im Gegensatz zu diesen Schlußfolgerungen stehen die Untersuchungen des Flusses von Ca^{++} durch Lecithin-Membranen. Die Abhängigkeit des Flusses durch diese Membranen verhält sich sowohl bei einer Variation der Calcimycinkonzentration bei konstanter Ca^{++}-Konzentration sowie bei einer Variation der Ca^{++}-Konzentration und konstanter Calcimycinkonzentration linear. Dieser experimentelle Befund stimmt nicht mit dem obigen Modell überein und weist auf einen Ca^{++}-Transport in Form eines 1:1-Komplexes hin/32/.

A.H. Caswell und B.C. Pressman /34/ zeigen mit ihren Untersuchungen, daß in polaren Lösungen (z.B. Methanol/Wasser) der 1:1-Komplex und in apolaren Lösungen (z.B. Chloroform) bevorzugt der 2:1-Komplex gebildet wird. Der erste Schritt des Ca^{++}-Transports muß daher ihrer Meinung nach mit der Bildung eines 1:1-Komplexes eingeleitet werden.

G.D. Case, J.M. Vanderkooi und A. Scarpa /35/ untersuchten die Wechselwirkung von Calcimycin mit Ca^{++}, Mg^{++} und Mn^{++} im sarcoplasmatischen Reticulum und in Mitochondrien. Im Rahmen dieser Arbeit sind die Fluoreszenzeigenschaften des Calcimycins zur Detektion der Komplexbildung mit Ca^{++} genutzt worden. Aufgrund dieser Messungen wird angenommen, daß sich an der Oberfläche der Membran ein einfach positiv geladener 1:1-Komplex bildet, der in der inneren, unpolaren Region der Membran einen zweiten Liganden bindet.

4.2. Physikalisch-chemische Eigenschaften des Calcimycins

Calcimycin - oft auch als A23187 bezeichnet - wird aus Kulturen der Streptomyces chartrensensis gewonnen/36/. Es liegt nach der Isolierung als gemischtes Magnesium/Cal-

ciumsalz vor, welches in die kristalline freie Säure umgewandelt werden kann/36/. Die freie Säure $C_{29}H_{37}N_3O_6$ hat ein Molekulargewicht von 523 Dalton. Die Struktur dieser Verbindung geht aus Abb.28 hervor.

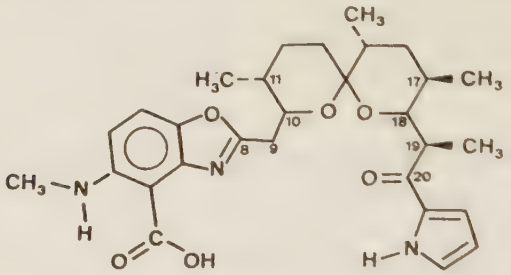


Abb.28:Struktur des Calcimycins

Das Antibiotikum weist als wesentliche Strukturmerkmale einen Benzoaxazol-, einen Keto-pyrrol-Rest und eine Spiroketaleinheit auf. Die Konformation des Antibiotikums (siehe Abb.29) wurde unter Anwendung der Röntgenstrukturanalyse ermittelt/36/. Das Calcimycin zeigt eine quasi-zyklische Anordnung. Dieser Konformationszustand wird durch die Ausbildung von drei intramolekularen Wasserstoffbrücken stabilisiert.

Ebenfalls mit der Methode der Röntgenstrukturanalyse sind Kristalle des 2:1-Ca^{++}-Komplexes untersucht worden/37/. Das Ca^{++} koordiniert jeweils an die Carboxylatgruppe, an das Stickstoffatom des Benzoaxazol- und an die Carbonylgruppe des Alpha-Keto-pyrrol-Rests. Die Konformation des Calcimycins im Ca^{++}-Komplex wird durch die Bildung jeweils einer intramolekularen Wasserstoffbrücke zwischen der Carboxylat- und der N-Methyl-Amino-Gruppe des Benzoaxazolrest sowie durch Bildung jeweils einer intermolekularen Wasser-

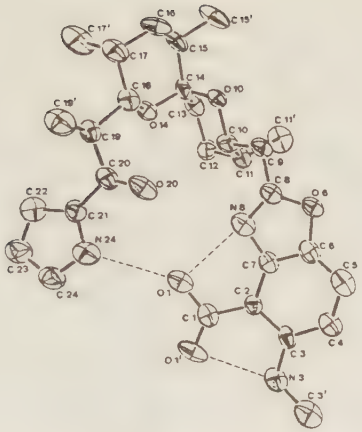


Abb.29:Konformation des kristallinen Calcimycins (freie Säure). (---) Intramolekulare Wasserstoffbrücke /36/.

stoffbrücke zwischen dem koordinierten Sauerstoffatom der Carboxylatgruppe und dem Wasserstoffatom des gegenüberliegenden Pyrrolstickstoffs bestimmt (vgl. Abb.30). Am Ca^{++} ist ein Wassermolekül koordiniert.

Studien zur Konformation von Calcimycin und seines 2:1-Ca^{++}-Komplexes in Lösung mit Hilfe von H^1- und C^{13}-NMR-Messungen führen zu ähnlichen Resultaten/38/. Der größte Unterschied zwischen der Konformation der freien Säure und der des komplexierten Calcimycins konnte anhand des dihedrischen Winkels des Strukturelements C_8-C_9-C_{10}-C_{11} (vgl.Abb.28) festgestellt werden. Daraus wurde abgeleitet, daß sich bei der Komplexbildung das Calcimycin weiter öffnet als im ungebundenen Zustand.

Informationen über die Kationenselektivität des 2:1-Kom-

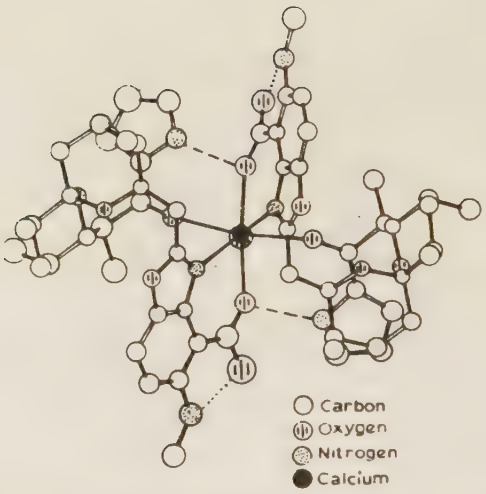


Abb.30:Struktur des 2:1-Ca^{++}Komplexes im kristallinen Zustand. (...) Intramolekulare Wasserstoffbrücke, (---) Intermolekulare Wasserstoffbrücke/37/.

plexes wurden mit Hilfe von 2-Phasenextraktionen und der Bestimmung der Extraktionskonstanten erhalten/39/. Der Betrag dieser Konstante wird ausgehend von Mg^{++} mit zunehmendem Kationenradius bis Zn^{++} kleiner und danach größer. D.R. Pfeiffer und H.A. Lardy schlossen daraus, daß die Kavität des Calcimycins die günstigsten Wechselwirkungen gegenüber Zn^{++} erlaubt.

D.R. Pfeiffer und C.M. Deber führten H^1-NMR- und CD-Studien an den 2:1-Komplexen von Calcimycin mit verschiedenen Kationen in Chloroform durch, um die Abhängigkeit der Konformation des koordinierten Calcimycins von der Größe des Kations zu überprüfen/40/. Die Interpretation der H^1-NMR-Spektren der 2:1-Komplexe hat zu keiner Klärung des

Problems geführt. Aufgrund dieser Spektren konnte kein Hinweis auf die unterschiedliche Konformation der 2:1-Komplexe mit verschiedenen Kationen gefunden werden. Die CD-Spektren dagegen weisen auf eine charakteristische Abhängigkeit vom Radius der Kationen hin. Die CD-Spektren der 2:1-Komplexe des Calcimycins mit Mg^{++}, Ni^{++}, Co^{++} und Zn^{++} zeigen keinen Unterschied. Jedoch wurden spektrale Unterschiede zwischen diesen Spektren und den Spektren der Komplexe A_2Sr, A_2Ca und A_2Mn gefunden. Daraus wurde abgeleitet, daß der Ligand für die Bindung von Kationen, die einen größeren Radius als Zn^{++} haben, seine Konformation im Sinne einer Aufweitung ändert.

Erste Experimente zur Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten in polaren Medien sind von Case, Vanderkooi und Scarpa unter Anwendung der Fluoreszenz-Spektroskopie durchgeführt worden/35/. Aus ihren Messungen geht hervor, daß für den 1:1-Calcimycinkomplex mit Mg^{++} und Ca^{++} etwa die gleichen Stabilitäten zu erwarten sind.

4.3 Problemstellung und Darstellung der Vorgehensweise

Ergänzend zur der in Abschn.1.2. beschriebenen Aufgabenstellung der hier vorliegenden Arbeit soll der zweite Teil eingehender dargelegt werden.

Um einen Beitrag zum Verständnis des Mechanismus des selektiven Erdalkaliionentransports durch niedermolekulare Ionencarrier zu leisten, sollen die relevanten physikalisch-chemischen Eigenschaften von Calcimycin - einem der bekanntesten Calciumcarrier - in homogener Lösung untersucht wer-

den. In diesem Zusammenhang interessieren insbesondere die Kationenspezifität und die Protolyse von Calcimycin. Es sind sowohl die Gleichgewichtskonstanten der Komplexbildung zwischen Calcimycin und den Erdalkaliionen Mg^{++} und Ca^{++} in Abhängigkeit vom pH-Wert als auch die dynamischen Parameter zu bestimmen. Alle in dieser Arbeit beschriebenen Untersuchungen werden in einem 30% Wasser in Methanol-Gemisch (Gew./Gew.) durchgeführt. Dieses Gemisch wird als Modellmedium für die Wasser/Membran-Grenzschicht betrachtet/13/. Die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der Protolyse und der Erdalkaliionenkomplexbildung sollen mit Hilfe von spektralphotometrischen Titrationen erfolgen. Die kinetischen Parameter sind mit der Stopped flow-Methode und der Temperatur-Sprung-Relaxationsspektrometrie zu bestimmen. Sowohl die Protonierung bzw. Deprotonierung von Calcimycin als auch die Bindung von Mg^{++} und Ca^{++} an Calcimycin sind bei den Gleichgewichtsuntersuchungen und den kinetischen Studien durch die Detektion der Absorptions- und Fluoreszenzeigenschaften dieses Moleküls und seiner Komplexe zu registrieren. Die kinetischen Untersuchungen, mit denen man eine Information über die zeitliche Abhängigkeit der Komplexbildungsreaktion erhält, sollen Aufschluß über den Reaktionsmechanismus geben. Untersuchungen an einfachen Metallionenkomplexen haben gezeigt/41/, daß die Geschwindigkeitskonstante der Wassersubstitution der inneren Hydratationshülle für Ca^{++} etwa 3000-mal größer ist als für Mg^{++}. Es ist somit zu erwarten, daß die Komplexbildung des Calcimycins mit Mg^{++} langsamer erfolgt als mit Ca^{++}.

5. Material und Methoden

5.1. Chemikalien und Materialien

Das Calcimycin (A23187) als freie Säure ist bei Calbiochem erhältlich. Die Reinheit dieser Verbindung ist mit der Methode der Dünnschichtchromatographie (Kieselgel $60F_{254}$ (Merck), Fließmedium: Chloroform:Methanol:Eisessig(100:3:12), R_f=0.67) und anhand der Messung von H^1-NMR-Spektren (Bruker WH 270) in $CDCl_3$ untersucht worden. Diese Messungen ließen keine Verunreinigungen erkennen. Stabilitätstests von Calcimycin in Methanol (Merck) und in 30% Wasser in Methanol (Gew./Gew.) bei 7°C ergeben mit Hilfe von NMR-Messungen nach 14 Tagen Aufbewahrung keine Hinweise auf eine Zersetzung der Substanz.

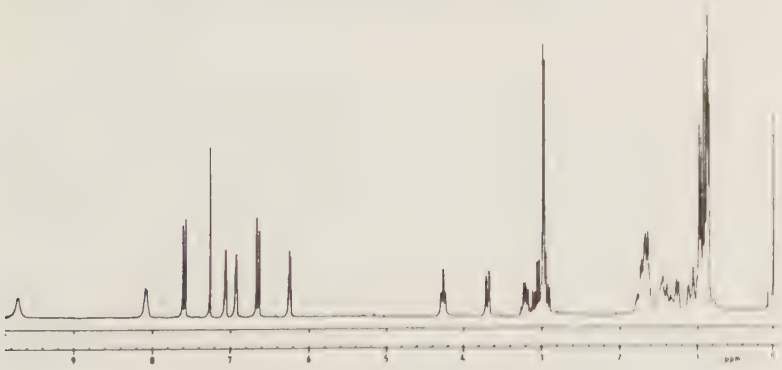


Abb.31: H^1-NMR-Spektrum einer 14 Tage alten methanolischen Calcimycinlösung. Zur Aufnahme des Spektrums wurde die Lösung einrotiert, 24h bei 0.01Torr über P_2O_5 getrocknet und in $CDCl_3$ gelöst.

$MgCl_2.6H_2O$ (Merck), $CaCl_2.4H_2O$ Suprapur (Merck), schwermetallionenfreies TES und MES (Calbiochem GmbH) sind ohne zusätzliche Reinigung verwendet worden. Tetramethylammoniumchlorid (TMACL) purum (Fluka AG) wird durch Umkristallisation aus Äthanol abs. gereinigt und 3 Tage im Excikkator bei 0.01 Torr und Raumtemperatur über P_2O_5 getrocknet. Tetramethylammoniumhydroxid (TMAOH) purum (Fluka AG) wird ebenfalls durch Umkristallisation aus Äthanol gereinigt, jedoch unter Stickstoffatmosphäre. Das Produkt wird im Excikkator unter P_2O_5 getrocknet und bei -15^oC aufbewahrt. Zur Herstellung der Meßlösungen werden Methanol Uvasol (Merck) und tridest. Wasser verwendet.

Die Reinigung der zur Anwendung gelangenden Glasgefäße, Spritzen (Hamilton) und Küvetten (Hellma) erfolgt durch 1%-ige RBS-Lösung (Roth), durch Spülen mit bidest. Wasser und mit 0.05M warmer HCl. Nach anschließendem Spülen mit bidest. Wasser werden die Gläser mit Methanol p.A. und Methanol Uvasol gespült und bei 40^oC in einem Trockenschrank (Heraeus) getrocknet. Zur Vermeidung einer Kontamination der Lösungen mit Metallionen werden nur Spritzen ohne Metallkanülen benutzt.

Die Calcimycin-Stammlösungen ($5 \cdot 10^{-4}$M) werden mit Methanol Uvasol hergestellt und unter Lichtausschluß bei 7^oC während max. 7 Tage aufbewahrt. Die 30% Wasser in Methanol-Mischung (Gew./Gew.) für die Messungen wird gravimetrisch hergestellt.

Die pH-Werte der Pufferlösungen in diesem Lösungsmittelgemisch werden mit dem pH-Meter E603 (Metrohm) gemessen und der pH-Wert mit gereinigtem TMAOH eingestellt. Vor jeder pH-Messung wird die pH-Einstabmeßkette (Metrohm) mit drei wässrigen Standardpuffern (Radiometer) unter-

schiedlichen pH-Werts geeicht. Der pH-Wert in einem 30% Wasser in Methanol-Gemisch (Gew./Gew.) unterscheidet sich von dem in einer 100% wässrigen Lösung. Nach Rorabacher ist der Unterschied gering/42/. Die pH-Abweichung beträgt etwa 0.1. Die Anwendung einer speziellen Elektrode für methanolische Lösungen ist daher nicht erforderlich.

Zur genauen Berechnung des Anfangsvolumens des eingewogenen Küvetteninhalts bei Titrationen wird die Dichte des Mediums gemessen. Die mit dem Dichtemeßgerät DMA 02C (Anton Paar K.G.,Graz (Österreich)) gemessene Dichte von 16mM TES/TMAOH (pH 7.4) in 30% Wasser in Methanol (Gew./Gew.) enthaltend 0.1M TMACL beträgt bei 25°C (0.8687 ± 0.0001) g/cm^3.

5.2. Methoden

5.2.1. Spektralphotometrische Titrationen

5.2.1.1. Titration mit Absorptionsdetektion und Auswertung

Die Titrationen mit Absorptionsdetektion - außer den pH-Titrationen - werden mit einer automatischen Titrationsapparatur, die in der Arbeitsgruppe entwickelt worden ist, durchgeführt/43/. Die Titrationsapparatur besteht - wie in Abb.32 dargestellt - aus dem Dioden-Array-Photometer HP 8450A (Hewlett Packard), zwei Motorbüretten Microlab M (Hamilton), einem Tischrechner HP 9815 (Hewlett Packard), einem HP 1000-Computer (Hewlett Packard), zwei elektronisch gesteuerten Rührmotoren mit Rührern aus inertem Material, einem pH-Meter E 600 (Metrohm), einem Digital-

thermometer Fluke 2180A (Fluke) und einem Thermostaten MGW Lauda TUK 30 (Lauda).

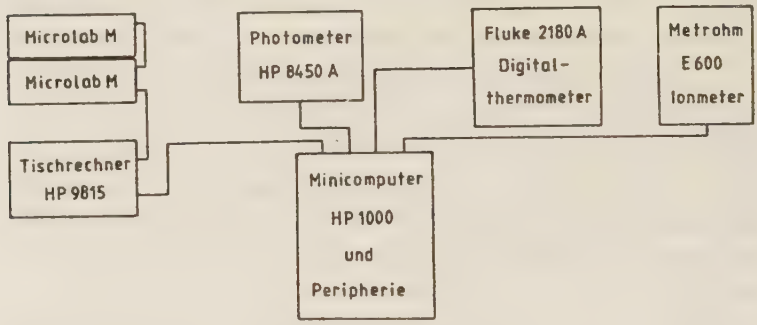


Abb.32: Schematischer Aufbau der automatischen Titrationsapparatur

Die Motorbüretten werden von dem Tischrechner überwacht und gesteuert. Das für die Steuerung notwendige Programm enthält Angaben über die Anfangskonzentrationen des Liganden und des Titranden, das Anfangsvolumen in der Küvette sowie die Zugabevolumina der Titrandenlösung. Weiterhin enthält dieses Programm spezielle Parameter wie Zugabegeschwindigkeit der Titrandenlösung, Wartezeiten zwischen den Zugaben etc. Die verwendeten 50 µl-Spritzen (Hamilton) der Motorbüretten werden automatisch aus einem Vorratsgefäß mit der Titrandenlösung gefüllt und der Inhalt der Spritzen über Teflonschläuche in die Küvetten (Meß- und Referenzküvetten) zugegeben. Das Gesamtvolumen der 50 µl-Spritzen hat eine Ungenauigkeit von ±0.15% (±0.08 µl). Die Zugabeungenauigkeit für Zugaben kleiner als 0.3 µl ist größer als 30% und für Zugaben größer als 5 µl etwa

18. Auf den Küvetten sind jeweils zwei Rührmotoren mit Rührern installiert. Direkt nach der Zugabe eines bestimmten Volumens der Titrandenlösung wird die Bürette in Wartestellung gebracht. Während der Wartezeit sorgen die Rührer für eine homogene Durchmischung der Lösungen in den Küvetten. Danach wird mit dem Photometer ein Absorptionsspektrum in einem Wellenlängenbereich von 200 - 800 nm gemessen und im HP 1000-Computer gespeichert. Das Photometer hat eine Amplitudenauflösung für den Extinktionsbereich kleiner eins von 10^{-4} im Wellenlängenbereich oberhalb 260 nm.

Die Titration wird mit dem Programm "TITRA", das im HP 1000-Computer gespeichert ist, gestartet/44/. Mit Hilfe des Programms "TITRA" wird die gesamte Titrationsapparatur gesteuert, alle Daten im HP 1000-Computer gespeichert sowie nach Beendigung der Titration ein Meßprotokoll erstellt.

Nach erfolgter Speicherung aller Spektren einer Titration werden die Spektren mit dem Programm "TITMB" Nullinien korrigiert und für die graphische Darstellung auf die Anfangskonzentration des Liganden bezogen, d.h. die Verdünnung der Lösung in der Küvette während der Titration wird berücksichtigt (Volumenkorrektur)/45/. Danach wird für diese Spektren ein File kreiert, um mit dem Programm "TIT3D" die Spektren mit Hilfe des Plotters HP 9872S zeichnen zu können/45/. Das Programm "FRM3D" dient zur Festlegung der Achsen, der Achsenteilung und der Achsenbeschriftung des Koordinatensystems/45/.

Mit dem Programm "WPICK" ist es möglich bei einer oder mehreren Wellenlängen die Extinktionen aus den Spektren herauszugreifen/44/. Die anschließende Darstellung der Extinktionen in Abhängigkeit von der Titrandenkonzentration ist die Grundlage für die Berechnung der Gleichgewichts-

konstanten bei einer bestimmten Wellenlänge. Diese Berechnung wird mit dem Programm "KOM11" durchgeführt/46/. Das Programm paßt die beste Kurve an die Meßpunkte an. Die so erhaltene Titrationskurve kann mit Hilfe des Programmes "KPLT2" entweder mit dem Plotter 9872S gezeichnet werden oder es kann eine Hardcopy vom Bild des Bildschirms angefertigt werden/45/. Die Achsen, Achsenteilung und -beschriftung des Koordinatensystems werden mit dem Programm "FRM2D" festgelegt/45/.

Alle pH-Titrationen mit Absorptionsdetektion werden manuell durchgeführt. Die Meßlösung wird in einem Vorratsgefäß hergestellt. Die Einstellung des pH-Wertes der zu untersuchenden Lösung erfolgt durch Zugabe einer Base (TMAOH) in ein Vorratsgefäß. Nach Einstellung des pH-Wertes wird die Küvette mit der im Vorratsgefäß befindlichen Lösung gefüllt und danach das Absorptionsspektrum der Lösung gemessen. Nach der Aufnahme des Spektrums wird die Küvette geleert und gereinigt. Im Vorratsgefäß wird nun ein neuer pH-Wert durch Zugabe von TMAOH eingestellt, die Küvette mit der Lösung mit diesem pH-Wert gefüllt und deren Spektrum gemessen. Diese Vorgehensweise wiederholt sich bis zum Ende der pH-Titration. Die basische Lösung ist stark konzentriert (1.5M TMAOH), so daß geringe Volumina in das Vorratsgefäß zugegeben werden müssen. Da das Vorratsgefäß außerdem ein großes Volumen (100 ml) hat, ist die Verringerung der Konzentration des Liganden durch Verdünnung bis zur Beendigung der Titration vernachlässigbar klein (0.1%). Die so erhaltenen Spektren werden, wie oben in diesem Abschnitt beschrieben, ausgewertet. Das Programm zur Berechnung der protolytischen Gleichgewichtskonstanten heißt "KOAPH"/46/.

5.2.1.2. Titration mit Fluoreszenzdetektion und Auswertung

Titrationen mit Fluoreszenzdetektion - außer den pH-Titrationen - werden mit dem Fluorimeter JY3C (Jobin Yvon), einer Motorbürette Microlab M (Hamilton), zwei Tischrechnern HP 9815 (Hewlett Packard), einem Plotter 9862A (Hewlett Packard) und einem Rührermotor mit Glasrührer, der auf die Küvette installiert wird, durchgeführt. Der schematische Aufbau geht aus Abb.33 hervor.

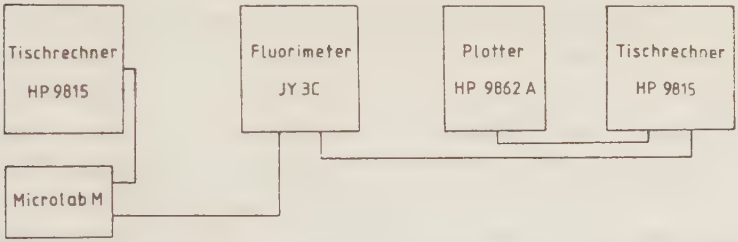


Abb.33:Schematischer Aufbau der experimentellen Anordnung für Titrationen mit Fluoreszenzdetektion

Ein Tischrechner dient auch hier zur Steuerung der Motorbürette. Das Steuerungsprogramm hat die im Abschn.5.2.1.1. beschriebenen Funktionen. Der zweite Tischrechner steuert das Fluorimeter und den Plotter. Dazu müssen die Wellenlängen- und Intensitätsintervalle sowie die minimale und maximale Wellenlänge in ein Programm, das auf Kasette gespeichert ist, eingegeben werden.

Die nach der Titration erhaltenen Meßdaten werden für die Auswertung in ein dafür kreiertes File, das im HP 1000-Computer abgespeichert ist, eingegeben. Für die

Berechnung der Gleichgewichtskonstanten sind Angaben über die folgenden Größen erforderlich: Liganden- und Titrandenkonzentration, rel. Fluoreszenzintensität, Auswertungsgrenzen, Schätzwert für die Gleichgewichtskonstante. Für die Auswertung und die graphische Darstellung werden die in Abschn.5.2.1.1. beschriebenen Programme benutzt.

Alle pH-Titrationen mit Fluoreszenzdetektion werden wie die pH-Titrationen mit Absorptionsdetektion durchgeführt.

5.2.2. Stopped flow-Apparatur und Auswertung der Meßkurven

Alle Stopped flow-Messungen werden mit der Stopped flow-Apparatur der Firma Union Giken durchgeführt (vgl. Abb.3). Die Apparatur ermöglicht das schnelle Mischen zweier Reaktionskomponenten im Millisekundenbereich und die zeitabhängige Detektion der Absorption und der Fluoreszenz des Reaktionsgemisches. Das Prinzip der Stopped flow-Methode wird in Abschn.1.1. erklärt. Die Drei-Komponenten-Stopped flow-Apparatur wird nicht angewandt, da diese Apparatur zum Zeitpunkt der Messungen keine Kanülen aus chemisch inerten Metallteilen aufwies. Bei der japanischen Stopped flow-Apparatur kommen die Lösungen nicht mit Metallteilen in Berührung, sondern nur mit Teflon und Glasteilen, welche gegenüber organischen Lösungen resistent sind. Die Fluoreszenzmessungen werden mit einer 2 mm-Meßzelle durchgeführt. Für die Absorptionsmessungen wird eine 10 mm-Meßzelle - nach eigenen Angaben von der Firma Hellma hergestellt - aus Quarzglas angewandt. Die Zuführungen zur Mischkammer sind verändert worden. Um ein Fließen der

Lösungen von einem Reservoir über die Mischkammer in das andere Reservoir zu verhindern, sind vor der Mischkammer zwei Rückschlagventile eingebaut worden.

Die Meßdaten werden von der Stopped flow-Apparatur zu einem digitalen Speicheroszilloskop (Nicolet) übertragen und dort auf einer Diskette gespeichert. Mit einem anderen digitalen Speicheroszilloskop (Nicolet) werden diese Daten über ein spezielles Interface zum HP 1000-Computer übertragen. Die Übertragung der Meßdaten wird mit dem Programm "XPLCN" durchgeführt. Dabei sind die folgenden Angaben notwendig: Abszisse und Ordinate in Punkten/Zeiteinheit, Startwerte für die Auswertung der Messung. Als Startwerte müssen der Abszissenwert in Sekunden und der Ordinatenwert in Volt angegeben werden. Für jede Meßkurve wird mit den angegebenen Daten ein File kreiert, welches für die Auswertung zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Reaktion verwendet wird.

Die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten wird mit dem Anpassungsprogramm "SFEX1" durchgeführt/28/47/. Der Bestimmung dieser Konstanten liegt das folgende Reaktionsmodell zugrunde: Die Bildung des Reaktionsproduktes stellt eine Reaktion zweiter Ordnung und die Rückreaktion die einer erster Ordnung dar. Für die Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten wird Glg.(15) angewandt. Bei Absorptionsmessungen müssen die gemessenen Spannungswerte in Extinktionseinheiten umgerechnet werden. Im Programm sind daher die Spannung des Ausgangssignals S_o entsprechend der Ausgangskonzentration des Liganden, die Verstärkung V und die Offsetspannung U_o anzugeben. Außerdem müssen die Extinktionskoeffizienten der Gleichgewichtszustände A und C (siehe Glg.IV) und die Konzentrationen der Ausgangslösungen an-

gegeben werden/48/.

Für die Fluoreszenzmessungen werden äquivalente Koeffizienten (Fluoreszenzkoeffizienten) angegeben, welche nach den folgenden Gleichungen zu berechnen sind:

$$\alpha = \frac{F_{c_A^o}}{c_A^o} \qquad (21) \qquad \beta = \frac{F - c_A \alpha}{c_C} \qquad (22)$$

$$c_A = \frac{c_A^o - c_B^o - K^{-1}}{2} + \frac{1}{2}\sqrt{(c_A^o + c_B^o + K^{-1})^2 - 4c_A^o c_B^o} \qquad (23)$$

$$c_C = \frac{c_A^o + c_B^o + K^{-1}}{2} - \frac{1}{2}\sqrt{(c_A^o + c_B^o + K^{-1})^2 - 4c_A^o c_B^o} \qquad (24)$$

Hier bedeuten: c_A^o = Anfangskonz. des Stoffes A
c_B^o = Anfangskonz. des Stoffes B
K = scheinbare Gleichgewichtskonstante
c_A = freie Konz. von A
c_C = Konz. von C
$F_{c_A^o}$ = Fluoreszenzintensität des gelösten Stoffes A mit der Konz. c_A^o
F = Fluoreszenzintensität von C
α = Fluoreszenzkoeffizient von A^o
β = " von C

Es können vier Größen angepaßt werden: 1. Geschwindigkeitskonstante für die Hinreaktion, 2. Dissoziationskonstante, 3. Totzeit der Apparatur, 4. Verhältnis der Volumina der an der Reaktion beteiligten Ausgangslösungen im Reaktionsgemisch. Ungleiche Mischung kann bei verschiedenen Viskositäten der zu mischenden Lösungen, unterschiedlichen Strömungswiderständen in den Strömungswegen oder Druckdifferenzen zwischen beiden Reservoirs auftreten.

Die Geschwindigkeitskonstante für die Rückreaktion ergibt sich aus dem Produkt der Bildungsgeschwindigkeitskonstanten mit der Dissoziationskonstanten. Durch Angabe eines Filenamens im Aufruf des Programms "SFEX1" kann ein File kreiert werden, in das die experimentell ermittelten Daten und die Anpassungsdaten eingelesen werden. Mit diesem File, einem FRM2D-File (siehe Abschn.5.2.1.1.) und dem Programm "PSYMB"/45/ werden die experimentelle Kurve und die Anpassungskurve mit einem 9872S Plotter (Hewlett Packard) gezeichnet.

5.2.3. Temperatur-Sprung-Apparatur und Auswertung

Den Messungen nach der Temperatur-Sprung-Methode liegt ein Prinzip von van't Hoff zugrunde, das die Verschiebung eines chemischen Gleichgewichts aufgrund der Temperaturänderung einer Lösung beschreibt. Die van't Hoffsche Gleichung für konstanten Druck lautet:

$$\left.\frac{\partial \ln K}{\partial T}\right|_p = \frac{\Delta H}{RT^2} \qquad (25)$$

Hier bedeuten: K = Gleichgewichtskonstante
T = Temperatur
R = Gaskonstante ($R = 8.31\ J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$)
ΔH = Enthalpiedifferenz

Die Aufheizung der Lösung wird in einer Elektroden-Zelle realisiert, über die ein Hochspannungskondensator entladen wird (siehe Abb.34) und führt zu einem Temperaturanstieg von max. 7°C.

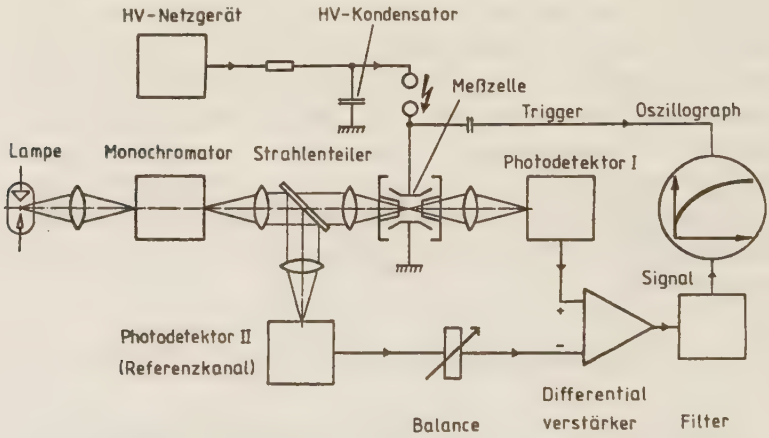


Abb.34: Schema der Temperatur-Sprung-Apparatur nach De Maeyer und Rabl /53/54/.

Die Beobachtung schneller Reaktionen hängt von der Aufheizzeit der Lösung ab. Die Aufheizzeit ist vom Widerstand der Meßzelle mit der Meßlösung und von der Kapazität des Hochspannungskondensators abhängig und wird somit durch die folgende Glg.(26) ausgedrückt:

$$\tau_{Heiz} = \frac{1}{2} R \cdot C \qquad (26)$$

Die hier verwendete Meßzelle mit einer Schichttiefe von 20 mm hat mit der Probenlösung einen Widerstand um 150 Ohm. Der verwendete Hochspannungskondensator hat eine Kapazität von 50nF. Daraus ergibt sich aufgrund von Glg.(26) eine Aufheizzeit von 3.7 µs. Das bedeutet: Reaktionen, die langsamer als etwa 4 µs sind, können noch beobachtet werden. Die Temperaturerhöhung ΔT bei Entladung des Kondensators ergibt sich aus der folgenden Glg.(27):

$$\Delta T = \frac{z^{-1}}{c_p \rho} \frac{1}{2} \cdot C \cdot U^2 \qquad (27)$$

Hier ist Z eine Zellenkonstante, ρ die Dichte der Lösung, c_p die spezifische Wärmekapazität, U die Spannung am Kondensator und C die Kapazität des Kondensators. Die experimentelle Bestimmung der Temperaturerhöhung ergibt für eine Hochspannung von 20 bis 30 kV und einer Kapazität von 50nF Werte zwischen 0.5°C und 2°C/49/.

Die durch die Temperaturerhöhung erfolgte Gleichgewichtsverschiebung führt zur Veränderung der Konzentration der Gleichgewichtszustände. Unterscheiden sich diese Zustände spektroskopisch, so kann die Relaxation des chemischen Gleichgewichts beobachtet werden. In den in Abschn.6.2.2. beschriebenen Experimenten wird das Absorptionsverhalten des Reaktionsgemisches verfolgt. Das am Photomultiplier registrierte Signal wird elektronisch verstärkt und mit einem digitalen Speicheroszilloskop

(Nicolet) zeitabhängig registriert und auf einer Diskette abgespeichert. Die Datenübertragung erfolgt wie bei der Stopped flow-Methode. Zur Bestimmung der Relaxationszeit der Reaktion wird das Programm "DISCRETE" verwendet /29/30/. "DISCRETE" ist ein Anpassungsprogramm, das die bestmögliche Lösung für die Relaxationszeit einer Reaktionskurve berechnet. Die berechnete Lösung besteht aus einer oder mehreren Exponentialfunktionen.

6. Komplexbildung von Calcimycin mit Magnesium- und Calciumionen

6.1. Spektroskopische Eigenschaften und Gleichgewichtsuntersuchungen

6.1.1. pH-Titrationen

Mit spektralphotometrischen pH-Titrationen soll die Gleichgewichtskonstante für die Deprotonierung des neutralen Zustand von Calcimycin ermittelt werden. Es wird die scheinbare Gleichgewichtskonstante bei konstanter Ionenstärke (0.1M) bestimmt. Die Protolyse im untersuchten pH-Bereich wird durch die folgende Reaktionsgleichung beschrieben:

$$A^- + H^+ \overset{K_{AH}}{\rightleftharpoons} AH \qquad \text{(VI)}$$

Calcimycin absorbiert im Wellenlängenbereich unterhalb von 440 nm. Die Spektren einer 10^{-5}M Calcimycinlösung bei 10 verschiedenen pH-Werten sind in Abb.35 dargestellt.

Das erste Spektrum (pH 4.28) der pH-Titration hat die folgenden Extremwerte: Maxima: 226 nm, 280 nm, 381 nm Minima: 251 nm, 325 nm. Das letzte Spektrum (pH 10.81) besitzt folgende Extremwerte: Maxima: 226 nm, 291 nm Minimum: 265 nm. Bei den Wellenlängen 262 nm und 350 nm sind zwei isosbestische Punkte zu erkennen. Die Auswertungen werden bei den Wellenlängen 280 nm, 324 nm und 380 nm durchgeführt. Abb.36 zeigt die Abhängigkeit der Extinktion vom pH-Wert zur Bestimmung des pK_{AH}-Wertes bei 380 nm. Der Auswertung liegen das Gesetz der Massenerhaltung, das

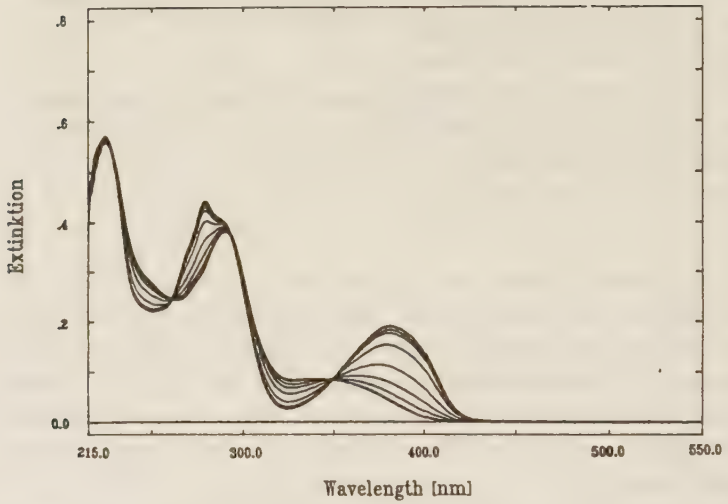


Abb.35: pH-Titration mit Absorptionsdetektion, exp. Bedingungen: d=2cm, T=25°C.

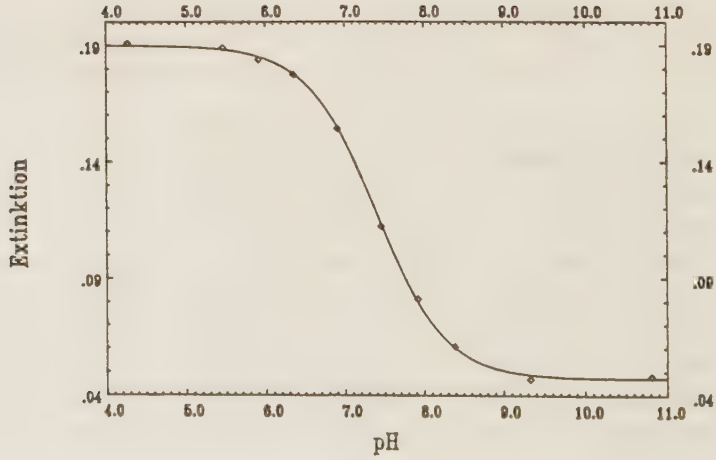
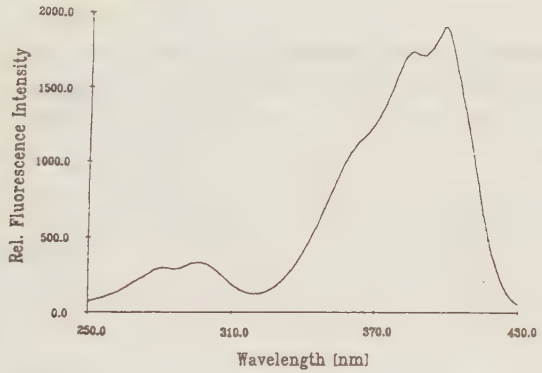


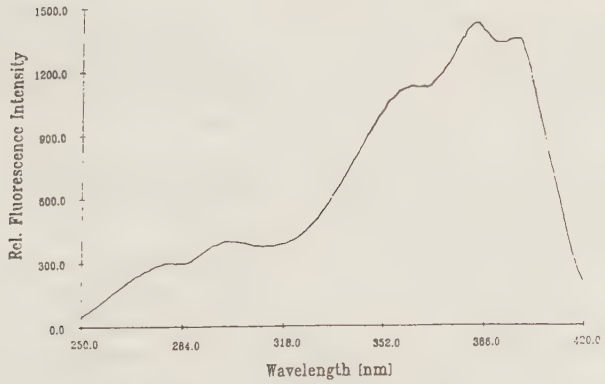
Abb.36: Abhängigkeit der Extinktion bei 380 nm vom pH-Wert. Die durchgezogene Linie ist eine durch Anpassung mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnete Kurve mit pK_{AH}=7.39. Exp. Bedingungen: wie Abb.35

Massenwirkungsgesetz und das Lambert-Beersche Gesetz zugrunde/43/. Die aus den Berechnungen erhaltenen pK_{AH}-Werte bei verschiedenen Wellenlängen werden gemittelt und die Standardabweichung bestimmt. Der mittlere pK_{AH}-Wert beträgt 7.38 ± 0.09

Auch die Fluoreszenzeigenschaften des Calcimycins erlauben eine pH-Titration. Das Anregungsspektrum einer Calcimycin-Lösung liegt zwischen den Wellenlängen 200 nm und 430 nm. Das der Emission befindet sich im Spektralbereich von 390 - 600 nm. In Abb.37 sind die Anregungsspektren einer 10^{-5}M Calcimycin-Lösung bei den pH-Werten 5.21 und 8.20 dargestellt.



(a)



(b)

Abb.37: Anregungsspektren einer 10^{-5}M Calcimycin-Lösung für pH 5.21 (a) und pH 8.20 (b), exp. Bedingungen: λ_{EMI}= 410nm, d=1cm, Spalte: 4nm, T=25°C.

Der Vergleich von Abb.37(a) mit (b) zeigt, daß es spektrale Änderungen im gesamten Anregungsspektrum gibt, wenn der pH-Wert erhöht wird. Die Intensität bei 296 nm vergrößert sich gegenüber der bei 281 nm leicht. Das Minimum zwischen diesen beiden Maxima verschwindet bei größeren pH-Werten. Ebenso vergrößert sich die Intensität bei 320 nm gegenüber 296 nm. Während das Maximum bei 385 nm für pH 5.21 kleiner ist als bei 398 nm, so ist bei pH 8.20 das Maximum bei 385 nm größer als bei 398 nm. Die Änderungen der Intensitäten in den Anregungsspektren zeigen die gleiche pH-Abhängigkeit wie die Änderungen der Extinktionen in den Absorptionsspektren bei 280 nm, 325 nm und 380 nm.

Bei Zugabe einer Base zu einer Calcimycinlösung verringern sich sowohl die Intensität der Anregungs- als auch die der Emissionsspektren. Zur Bestimmung des pK_{AH}-Wertes wird die Änderung der Emissionsspektren bei zunehmendem pH-Wert gemessen. Eine 10^{-5}M Calcimycin-Lösung wird bei 410 nm angeregt. Die rel. Fluoreszenzintensität wird zwischen 430 nm und 600 nm beobachtet. Während der Titration verschiebt sich das Emissionsmaximum bei 447 nm leicht zu kürzeren Wellenlängen. In Abb.38 ist eine spektralfluorimetrische pH-Titration mit Fluoreszenzdetektion abgebildet.

Die pK_{AH}-Werte werden bei den Wellenlängen 435 nm, 440 nm, 447 nm, 464 nm und 498 nm bestimmt. Abb.39 zeigt die Abhängigkeit der rel. Fluoreszenzintensität vom pH-Wert zur Bestimmung des pK_{AH}-Wertes bei 447 nm.

Die Mittelung aller pK_{AH}-Werte führt zu dem folgenden Wert: $pK_{AH}=7.34 \pm 0.01$

Werden die pK_{AH}-Werte, die durch pH-Titrationen mit

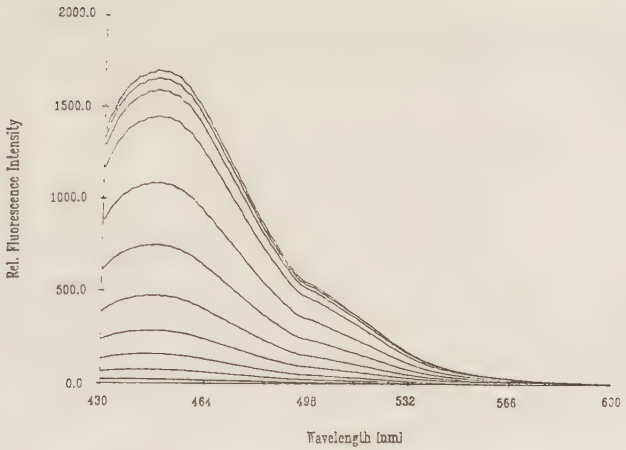


Abb.38: pH-Titration mit Fluoreszenzdetektion, exp. Bedingungen: $c_A^o = 10^{-5}$M, λ_{ANR} = 410nm, d=1cm, Spalte: 4nm, T=25°C.

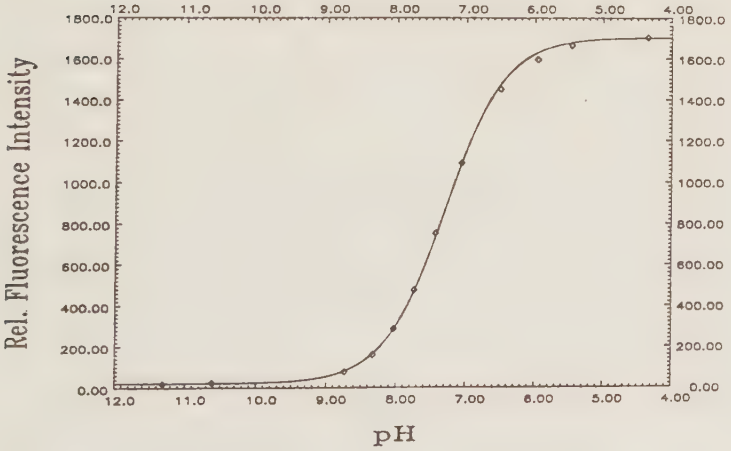


Abb.39: Abhängigkeit der rel. Fluoreszenzintensität vom pH-Wert. Die durchgezogene Linie ist die durch Anpassung mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnete Kurve mit pK_{AH}=7.30. Exp. Bedingungen: wie in Abb.38.

Fluoreszenz- und Absorptionsdetektion erhalten worden sind, gemittelt, so ergibt sich für den pK_{AH}-Wert der folgende Betrag:

$$pK_{AH}=7.34 \pm 0.09$$

Dieser experimentell ermittelte pK_{AH}-Wert wird in Abschn.6.1.3. verwendet, um die pH-unabhängigen Dissoziationskonstanten für die Komplexbildung von Calcimycin mit Mg^{++} und Ca^{++} zu bestimmen. In Abschn.7 wird dieser Wert mit denen der Literatur verglichen und seine Bedeutung für das membrangebundene Calcimycin diskutiert.

6.1.2. Untersuchung der Bindung von Magnesium- und Calciumionen an Calcimycin - Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten

In den folgenden Abschnitten werden die Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten der Komplexbildung von Calcimycin mit Ca^{++} und Mg^{++} in einem 30% Wasser in Methanol-Gemisch (Gew./Gew.) beschrieben. Es werden die scheinbaren Gleichgewichtskonstanten mit spektralphotometrischen Titrationen (Fluoreszenz und Absorption - vgl. Abschn.5.2.1.) mit $MgCl_2$ und $CaCl_2$ bestimmt. Die Messungen werden bei konstanter Ionenstärke (0.1M) durchgeführt. Die Komplexbildung mit Mg^{++} und Ca^{++} wird bei verschiedenen pH-Werten experimentell untersucht. Zum Konstanthalten des pH-Wertes der Lösungen werden die Puffer MES (pH 5.2, 6.0, 6.65) und TES (6.65, 7.45, 8.2) verwendet. Die Anwendung verschiedener Puffer bei gleichem pH-Wert ergab keine Beeinflußung der Komplexbildung. Während den Messungen schwankt der

pH-Wert um maximal ±0.02 pH-Einheiten. Der Einfluß von Anionen (z.B. Cl^-) auf die Komplexbildung ist nichtg untersucht worden. Alle Messungen werden bei 25°C durchgeführt. Der für die Fluoreszenzmessungen zu berücksichtigende Filtereffekt erster Ordnung, der die Intensitätsverringerung der Fluoreszenzemission aufgrund der Absorption der Lösung des anregenden Lichtes berücksichtigt, kann vernachlässigt werden.

Die Mg^{++}-Titrationen mit Fluoreszenzdetektion (pH 5.19, 6.02, 7.45 und 8.20) werden bei 435 nm, 440 nm, 447 nm, 464 nm, 498 nm und die mit Absorptionsdetektion (pH 6.65) wird bei 280 nm, 300 nm, 315 nm, 340 nm und 400 nm ausgewertet. Die Ca^{++}-Titrationen (pH 5.20, 6.02) mit Fluoreszenzdetektion werden bei Wellenlängen, wie sie für die Mg^{++}-Titrationen angegeben sind, ausgewertet. Bei pH 6.65 und 7.41 werden Ca^{++}-Titrationen mit Absorptionsdetektion durchgeführt. Hier wird bei 280 nm, 315 nm, 340 nm (pH 6.65) und 280 nm, 300 nm, 315 nm, 340 nm, 350 nm, 365 nm (pH 7.41) ausgewertet. Allen Auswertungen liegt das Gesetz der Massenerhaltung, das Massenwirkungsgesetz und das Lambert-Beersche Gesetz zugrunde /43/. Abb.40 zeigt eine Mg^{++}-Titration mit Fluoreszenzdetektion.

Die Auswertung der Titrationsdaten bei einer Wellenlänge wird unter der Annahme eines 1:1-Komplexbildungsmodells durchgeführt. Die Bildung eines 1:1-Komplexes kann mit der folgenden Reaktionsgleichung verdeutlicht werden (L = Ligand (Calcimycin), Me^{++} = Metallion):

$$L + Me^{++} \underset{}{\overset{K}{\rightleftharpoons}} LMe^{++} \qquad \text{(VII)}$$

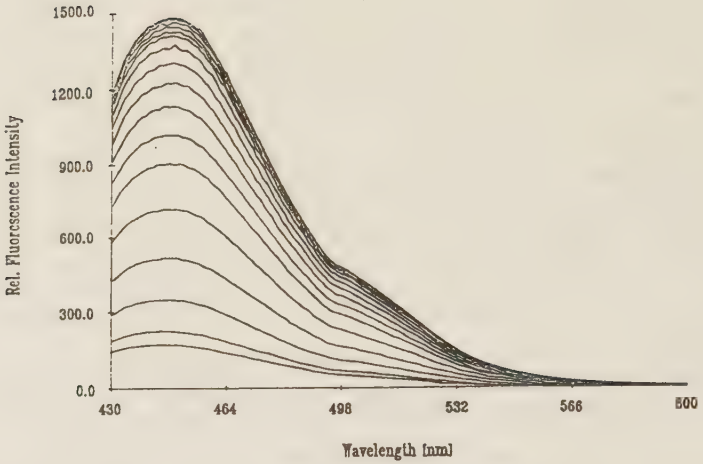


Abb.40: Mg^{++}-Titration mit Fluoreszenzdetektion, exp. Bedingungen: $c_A^o = 10^{-5}$M, $c_{Mg^{++}}$(Ende der Titration)$= 3.39 \cdot 10^{-2}$M, Puffer: 16mM MES, 0.1M TMACL, pH 6.02, T=25°C, λ_{ANR}= 410nm, d=1cm, Spalte: 4nm.

Abb.41 zeigt die Abhängigkeit der rel. Fluoreszenzintensität vom Logarithmus der Mg^{++}-Konzentration der in Abb.40 abgebildeten Titration bei 447 nm. Die aus diesen Auswertungen, die bei verschiedenen Wellenlängen durchgeführt werden, resultierenden pK-Werte werden im folgendem mit pK^* bezeichnet. Diese ermittelten pK^*-Werte sind pH-abhängig.

Die bei verschiedenen Wellenlängen erhaltenen pK^*-Werte sind gemittelt worden. Die Mittelwerte der pK^*-Werte und die sich aus der Berechnung dieses Mittelwertes ergebene

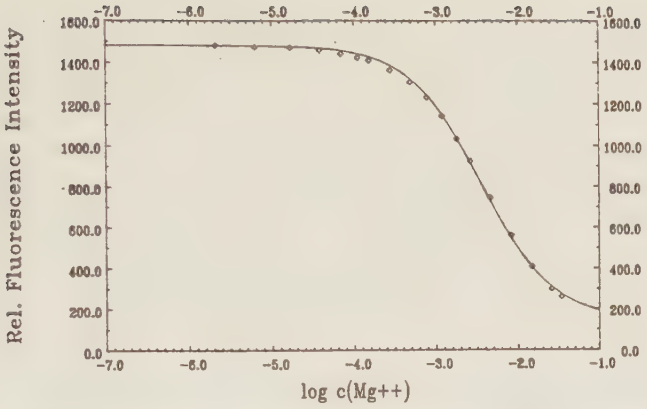


Abb.41: Abhängigkeit der rel. Fluoreszenzintensität vom Logarithmus der Mg^{++}-Konzentration bei 447nm. Die durchgezogene Linie ist die durch Anpassung mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnete Titrationskurve mit pK^{*}=2.45, exp. Bedingungen: wie in Abb.40

Standardabweichung sind in Tab.V aufgeführt.

pH	5.19	6.02	6.65	7.45	8.20
pK^{*}	1.83±0.02	2.45±0.01	3.11±0.12	3.86±0.02	4.05±0.02

Tab.V: pK^{*}-Werte der Mg^{++}-Titrationen

Aus den Ergebnissen der Mg^{++}-Titrationen ergibt sich kein Hinweis auf einen 2:1-Magnesiumkomplex. Es erweist

sich daher die Annahme der Bildung eines 1:1-Komplexes als richtig.

Auch die Ca^{++}-Titrationen können unter Zugrundelegung einer 1:1-Komplexbildung von Calcimycin mit Ca^{++} ausgewertet werden (siehe Glg.VII). Die Auswertungen der Ca^{++}-Titrationen ergeben ebenfalls keinen Hinweis auf einen 2:1-Komplex. Abb.42 zeigt eine Ca^{++}-Titration und Abb.43 die Auswertung dieser Titration bei einer Wellenlänge. Die mittleren pK^{*}-Werte sind in Tab.VI angegeben.

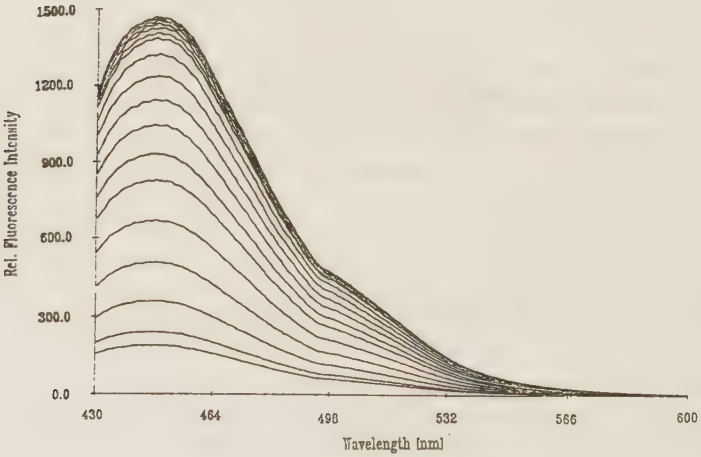


Abb.42: Ca^{++}-Titration mit Fluoreszenzdetektion, exp. Bedingungen: $c_A^o = 10^{-5}$M, $c_{Ca^{++}}$(Ende der Titration)$= 3.39 \cdot 10^{-2}$M, Puffer: 16mM MES, 0.1M TMACL, pH 6.02, T=25°C, λ_{ANR}=410nm, d=1cm, Spalte: 4nm.

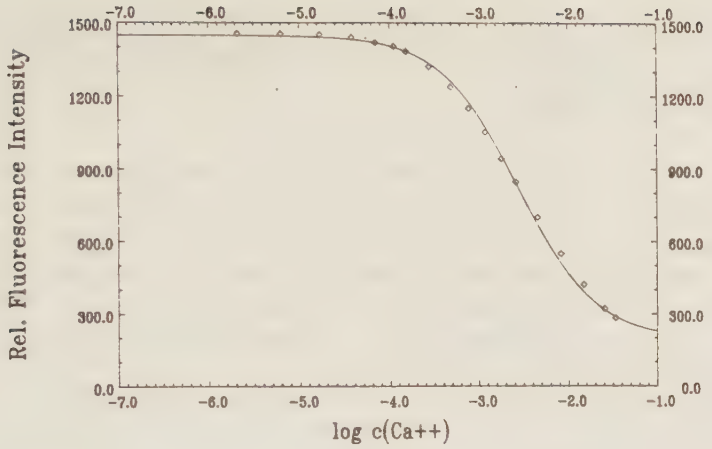


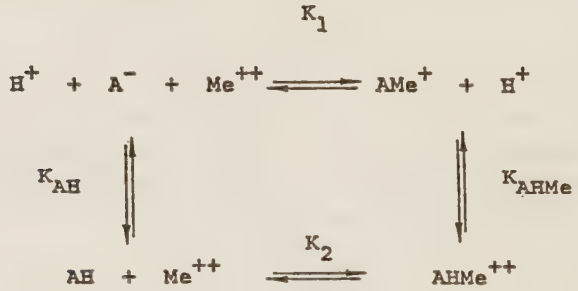
Abb.43:Abhängigkeit der rel. Fluoreszenzintensität vom Logarithmus der Ca^{++}-Konzentration bei 447nm. Die durchgezogene Linie ist die durch Anpassung mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnete Kurve mit pK^{*}=2.57, exp. Bedingungen: wie in Abb.42.

pH	5.20	6.02	6.65	7.41
pK^{*}	1.70±0.01	2.60±0.02	3.25±0.31	4.25±0.07

Tab.VI: pK^{*}-Werte der Ca^{++}-Titrationen

6.1.3. Interpretation der pH-Abhängigkeit der Komplexbildung von Calcimycin mit Magnesium- und Calciumionen

Die in Abschn.6.1.2. dargestellten Resultate zeigen, daß Calcimycin mit Mg^{++} und Ca^{++} in einem 30% Wasser in Methanol-Gemisch (Gew./Gew.) 1:1-Komplexe bildet. Die Gleichgewichtskonstante dieser Komplexe ist vom pH-Wert abhängig. Sie nimmt mit größer werdendem pH-Wert zu. Die 1:1-Komplexbildung kann mit dem folgendem Reaktionsschema dargestellt werden:



(VIII)

Hier wird vorausgesetzt, daß der Komplexbildung von AMe^+ ein protolytisches Gleichgewicht vorgelagert ist, daß durch die im Abschn.6.1.1. bestimmte protolytische Gleichgewichtskonstante K_{AH} ausgedrückt wird. Kinetische Studien, die die Untersuchung des Zerfalls von AMe^+ beschreiben, ergaben den Hinweis, daß die Bildung des Komplexes $AHMe^{++}$ im Reaktionsmodell berücksichtigt werden muß /50/. Die Komplexbildung von AMe^+ unter Einbeziehung dieser beiden Voraussetzungen kann mit dem obigen zyklischen Reaktionsmodell erklärt werden. Es wird als Grundlage für die

folgenden Berechnungen und die Diskussion der Komplexbildung von Calcimycin mit Mg^{++} und Ca^{++} genommen. Aufgrund dieses Reaktionsmodells kann die pH-Abhängigkeit des pK^*-Werts durch die folgende Gleichung ausgedrückt werden:

$$pK^* = pK_1 - \log\left(\frac{1 + \frac{10^{-pH}}{10^{-pK_{AH}}}}{1 + \frac{10^{-pH}}{10^{-pK_{AHMe}^{++}}}}\right) \qquad (28)$$

Der pH-unabhängige pK-Wert wird in Glg.(28) mit pK_1 bezeichnet. Im obigen Reaktionsmodell (Glg.VIII) entspricht dieser Wert der scheinbaren Dissoziationskonstanten von AMe^+. In Abb.44 wird die pH-Abhängigkeit des pK^*-Wertes dargestellt. Die durchgezogene Kurve in dieser Abbildung ist mit Glg.(28) berechnet worden. Die Kurve gilt nur für die Mg^{++}-Titration.

Die Auswertung der pH-Abhängigkeit der pK^*-Werte zeigt, daß pK_1 viel größer als pK_2 ist. Das bedeutet, daß $AHMe^{++}$ im Vergleich zum Komplex AMe^+ schwach besetzt ist. Die Auswertung ergibt einen pK_2-Wert von kleiner als 0.5. Der $pK_{AHMe}{}^{++}$ ist kleiner als 4.

Die beste Kurve in Abb.44 wird erhalten, indem das Minimum der Summe der Quadrate der Abstände der Meßpunkte von der Kurve gesucht wird. Sie wird mit einem HP 9815-Rechner (Hewlett Packard) berechnet und mit Hilfe eines HP 9862A-Plotters (Hewlett Packard) gezeichnet. Die so erhaltenen pH-unabhängigen pK_1-Werte für die Komplexbildung des Calcimycins mit Ca^{++} und Mg^{++} sind in der folgenden Tab.VII aufgeführt.

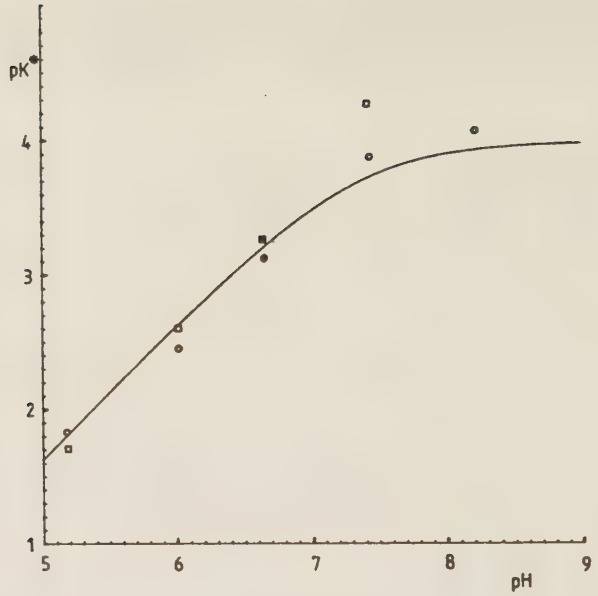


Abb.44:pH-Abhängigkeit der pK^*-Werte, Mg^{++}: o Fluoreszenz/ ● Absorption Ca^{++}: □ Fluoreszenz/ ■ Absorption

Komplexbildung des Calcimycins mit	pK_1
Mg^{++}	3.97 ± 0.18
Ca^{++}	4.09 ± 0.45

Tab.VII:Die pH-unabhängigen pK_1-Werte für die 1:1-Komplexbildung des Calcimycins mit Mg^{++} und Ca^{++}.

Die pH-unabhängigen pK_1-Werte für Mg^{++} und Ca^{++} unterscheiden sich im Rahmen der Fehlergrenzen nicht. Aufgrund der titrimetrischen Messungen ist es deshalb nicht möglich eine Selektivität der Bindung von Calcimycin mit Mg^{++} gegenüber Ca^{++} festzustellen. Der in Tab.VII angegebene Fehler für den pK_1-Wert ist die größte absolute Abweichung eines Meßpunktes von der Kurve.

6.2. Kinetische Untersuchungen

Zur Untersuchung dynamischer Aspekte der Komplexbildung von Calcimycin mit Mg^{++} und Ca^{++} eignen sich die Stopped flow-Methode und die Temperatur-Sprung-Methode. Die zeitabhängige Untersuchung der Komplexbildung von Calcimycin mit Mg^{++} wird mit einer Stopped flow-Apparatur untersucht. Für die Detektion werden die Fluoreszenz- und Absorptionseigenschaften genutzt. Da sich der Calcimycin/Ca^{++}-Komplex schneller bildet als der Calcimycin/Mg^{++}-Komplex wird hier die Temperatur-Sprung-Methode angewandt, wobei die Absorptionseigenschaften des Calcimycins bzw. die seiner Komplexe für die Detektion ausgenutzt werden. Alle kinetischen Experimente werden bei konstanter Ionenstärke (0.1 M) durchgeführt.

6.2.1. Stopped flow-Experimente

Die Stopped flow-Messungen werden mit der in Abschn.1.1. und 5.2.2. beschriebenen Apparatur durchgeführt. Bei Messungen mit Fluoreszenzdetektion wird die Lösung bei 410 nm angeregt. Vor der Detektion wird ein 418 nm-Kantenfilter (Schott) installiert, so daß keine Lichtquanten des Anregungs-

lichtes detektiert werden. Die Messungen werden mit einer 2 mm-Küvette (Totzeit = 0.5 ms) durchgeführt. Eine Abschätzung ergibt, daß der Filtereffekt 1.Ordnung auch hier vernachlässigt werden kann. Für die Absorptionsdetektion wird eine 10 mm-Küvette (Totzeit = 3.3 ms) verwendet.

Alle Messungen werden in dem hier angewandten Lösungsmittelgemisch bei 25°C durchgeführt. Die Reservoirs enthalten jeweils eine Calcimycin-Lösung und eine Lösung mit den Kationen Mg^{++}. Die Experimente werden mit zwei verschiedenen Calcimycinkonzentrationen (10^{-5}M und $4\cdot10^{-5}$M) und vier verschiedenen $MgCl_2$-Konzentrationen (10^{-4}M, $3\cdot10^{-4}$M, $7\cdot10^{-4}$M und $1.5\cdot10^{-3}$M) durchgeführt. In der folgenden Abb.45 wird ein Beispiel für eine Stopped flow-Messung und ihre Auswertung gegeben.

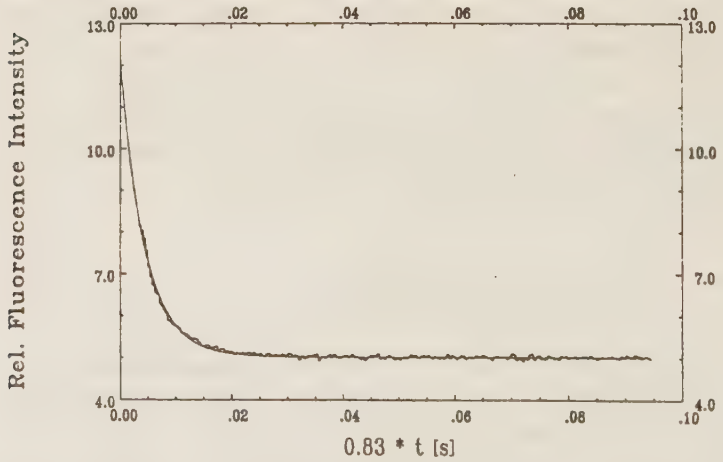


Abb.45: Stopped flow-Messung mit Auswertung. Die durchgezogene Kurve ist eine durch Anpassung mit der Methode der kleinsten Fehlerquadrate berechnete Kurve. Die berechneten kinetischen Parameter sind: $k^*_{on}=4.4\cdot10^5$ $M^{-1}s^{-1}$, $k^*_{off}=89$ s^{-1}, exp. Bedingungen: $c^o_A=4\cdot10^{-5}$M, $c^o_{Mg^{++}}=3\cdot10^{-4}$M, 16mM TES, 0.1M TMACl, pH 7.4, T=25°C, λ_{ANR}=410 nm, λ_{EMI}>420 nm.

Die Anpassung einer berechneten Kurve an die experimentelle zeigt (siehe Abb.45), daß der Calcimycin/Mg^{++}-Komplex in einem Reaktionsschritt gebildet wird. Die simulierte Kurve zur Bestimmung von k^*_{on} und k^*_{off} wird mit dem Programm "SFEX1" berechnet. Die Grundlage dieser Berechnung ist die Annahme der Bildung eines 1:1-Komplexes in einem Reaktionsschritt (vgl. Abschn.5.3.). Diese Annahme kann mit dem folgendem Reaktionsschema verdeutlicht werden (L = Ligand(Calcimycin), Me^{++} = Metallion):

$$L + Me^{++} \underset{k^*_{off}}{\overset{k^*_{on}}{\rightleftharpoons}} LMe^{++} \qquad \text{(IX)}$$

Die Amplitudenabnahme in Abb.45 bis zum Gleichgewichtszustand entspricht der Amplitudenänderung bei der Titration für diesen pH-Wert.

Die Stopped flow-Messungen werden bei verschiedenen pH-Werten durchgeführt. Die Auswertung ergibt die in Tab.VIII aufgeführten Werte für k^*_{on} und k^*_{off}. Für die Auswertung werden die berechneten Dissoziationskonstanten, (siehe Abb.44) für verschiedene pH-Werte verwendet.

Art der Detektion	pH	pK^{*a}	$k^*_{on}\,[M^{-1}s^{-1}]$	$k^*_{off}\,[s^{-1}]$
Fluoreszenz	7.40	3.70	$(3.0\pm0.9)\cdot10^5$	59±19
Fluoreszenz	6.70	3.24	$(8.6\pm1.2)\cdot10^4$	49±7
Absorption	6.70	3.24	$(1.1\pm0.4)\cdot10^5$	60±23
Fluoreszenz	6.00	2.60	$(3.0\pm0.5)\cdot10^4$	74±11

Tab.VIII:Kinetische Parameter der Komplexbildung von Calcimycin mit Mg^{++}, ^{a} Berechnete Werte.

Die in Tab.VIII dargestellten Resultate der Stopped flow-Messungen zeigen, daß die Geschwindigkeitskonstante k^*_{on} pH-abhängig und k^*_{off} pH-unabhängig ist. Die Darstellung der Abhängigkeit des log k^*_{on} vom pH-Wert ergibt die in Abb.46 gezeigte Funktion.

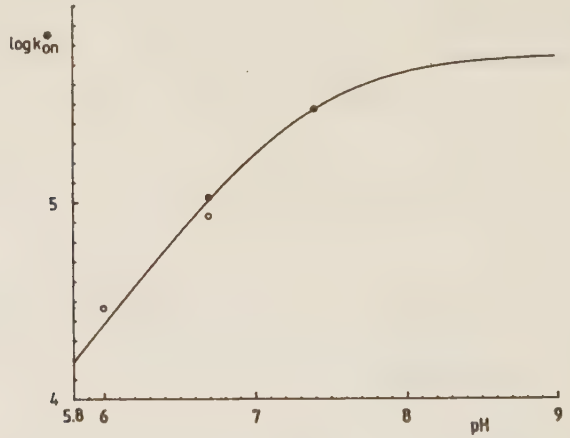
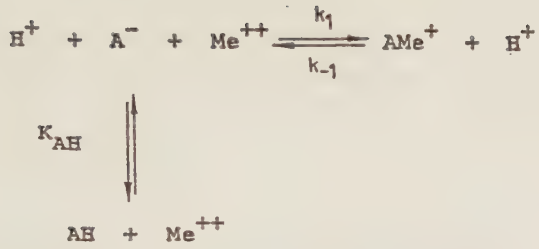


Abb.46: pH-Abhängigkeit des Logrithmus von k^*_{on}, o Fluoreszenz, ● Absorption.

Für die Betrachtung der pH-Abhängigkeit von k^*_{on} wird vorausgesetzt, das der Bildung des 1:1-Komplexes ein protolytisches Gleichgewicht vorgelagert ist. Diese Voraussetzung wird mit dem folgendem Reaktionsmodell veranschaulicht:



(X)

Die Kurve in Abb.46 wird auf dieser Grundlage mit der folgenden Glg.(29) berechnet:

$$\log k^{*}_{on} = \log k_1 - \log\left(1 + \frac{10^{-pH}}{10^{-pK_{AH}}}\right) \qquad (29)$$

Es wird auch hier die beste Kurve ermittelt, indem das Minimum der Summe der Quadrate der Abstände der Meßpunkte von der Kurve gesucht wird. Die sich aus Glg.(29) ergebene pH-unabhängige Geschwindigkeitskonstante für die Hinreaktion k_1 ist somit:

$$k_1 = (5.5 \pm 1.3) \cdot 10^5 M^{-1} s^{-1}$$

Die pH-unabhängige Geschwindigkeitskonstante für die Rückreaktion k^{*}_{off} wird im folgendem mit k_{-1} bezeichnet. Für den Mittelwert von k_{-1} ergibt sich:

$$k_{-1} = 60 \pm 18 s^{-1}$$

Der angegebene Fehler ist die sich bei der Mittelung

ergebene Standardabweichung. Berechnet man zur Überprüfung k_{-1} aus den pH-unabhängigen Werten pK_1 und k_1, so erhält man eine gute Übereinstimmung mit dem oben für k_{-1} angegebenen Wert:

$$k_{-1} = 59 s^{-1}$$

Die pH-Abhängigkeit der Geschwindigkeitskonstanten für die Komplexbildung von Calcimycin mit Mg^{++} kann so befriedigend erklärt werden. Eine detailliertere Diskussion der Ergebnisse und deren Konsequenzen für ein Transportmodell durch Membranen wird in Abschn.7 gegeben.

6.2.2. Temperatur-Sprung-Experimente

Die Zeitabhängigkeit der Komplexbildung des Calcimycins mit Ca^{++} wird mit der Temperatur-Sprung-Methode untersucht. Die Absorptionseigenschaften des Reaktionsgemisches erlauben Messungen bei den Wellenlängen 405 nm, 410 nm und 415 nm. Alle Messungen werden bei einer Temperatur von $(20 \pm 0.1)^{\circ}C$ durchgeführt. Der pH-Wert der verwendeten Lösungen ist 6.50. Die apparative Methode als auch die Auswertungsmethodik werden in Abschn.5.2.3. beschrieben. Abb.47 zeigt eine der experimentellen Relaxationskurven. Der Auswertung der Meßdaten wird eine 1:1-Komplexbildung des Calcimycins mit Ca^{++} zugrunde gelegt (siehe Glg.IX). Das Komplexbildungsgleichgewicht wird durch eine Relaxationszeit τ^* beschrieben. k^*_{on} ist die pH-abhängige Geschwindigkeitskonstante für die Hinreaktion und k^*_{off} die der Rückreaktion. Die in Abb.47 durchgezogene Kurve ist die an den Meßdaten am besten angepaßte theoretische Kurve. Die

Annahme einer einzigen Relaxationszeit reicht aus, um den experimentellen Verlauf der Reaktion zu beschreiben.

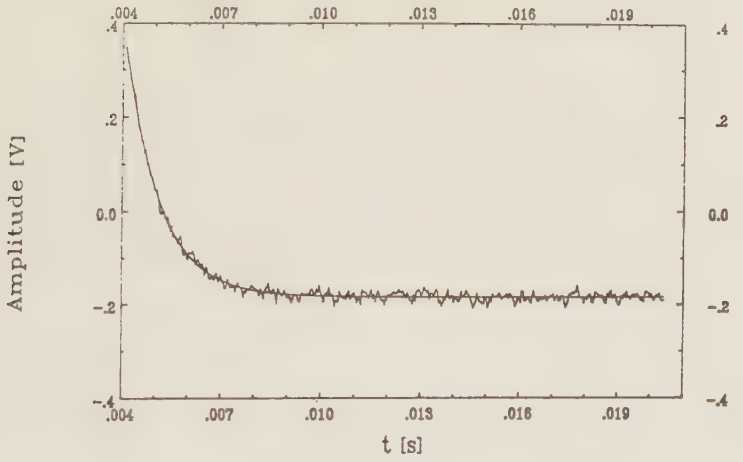


Abb.47: Temperatur-Sprung-Experiment mit Auswertung. Experimentelle Bedingungen: $c_A^o = 10^{-4}$M, $c_{Ca^{++}}^o = 10^{-4}$M, $1/\tau^* = 9.26 \cdot 10^2 s^{-1}$, λ = 405 nm, Gesamtamplitude = 30V, 32mM MES, 32mM TES, 0.1M TMACl, pH 6.50, T=20°C.

Da die Störung des chemischen Gleichgewichts durch den Temperatursprung klein gewählt worden ist, kann die angegebene Einstufenreaktion für das Calcimycin durch die folgende lineare Differentialgleichung dargestellt werden:

$$\dot{c}_A(t) = 1/\tau^*(\bar{c}_A - c_A(t)) \qquad (30)$$

Hier bedeutet $\bar{c}_A$ die Gleichgewichtskonzentration von Calcimycin. Für die Auswertung wird auf dieser Grundlage

der folgende Ausdruck für die inverse Relaxationszeit verwendet/13/:

$$\tau^{*-1} = k^*_{on}(\bar{c}_A + \bar{c}_{Ca^{++}}) + k^*_{off} \qquad (31)$$

$\bar{c}_A$ und $\bar{c}_{Ca^{++}}$ sind die freien Konzentrationen von Calcimycin und Ca^{++} in Lösung. Trägt man τ^{*-1} in einer graphischen Darstellung in Abhängigkeit von der Summe der freien Konzentrationen auf, so erhält man eine Gerade. Die Steigung dieser Geraden ist k^*_{on} und der Schnittpunkt mit der Ordinate ist k^*_{off}.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter der Komplexbildung von Calcimycin mit Ca^{++} sind Temperatur-Sprung-Experimente bei verschiedenen Konzentrationen durchgeführt worden. Die Resultate der Experimente gehen aus Tab.IX hervor.

In Abb.48 sind diese experimentellen Daten in der oben angegebenen Weise dargestellt. Die Gerade in Abb.48 ist durch lineare Regression berechnet worden. Die Berechnung ergibt die folgenden Werte für die Geschwindigkeitskonstanten:

$$k^*_{on} = (2.3 \pm 0.4)\ 10^6\ M^{-1}\ s^{-1}$$

$$k^*_{off} = 460 \pm 90\ s^{-1}$$

Das Verhältnis von k^*_{on}/k^*_{off} ist gleich 5000 und hat die gleiche Größenordnung wie die mit der theoretischen Kurve bestimmte Gleichgewichtskonstante (siehe Abschn.6.1.3.) bei pH 6.5. Die theoretisch bestimmte Gleichgewichtskonstante beträgt 1585.

c_A^o [M]	$c_{Ca^{++}}^o$ [M]	$\bar{c}_A + \bar{c}_{Ca^{++}}$ [M]	τ^{*-1} [s^{-1}]
$5.0 \cdot 10^{-5}$	$5.0 \cdot 10^{-5}$	$9.55 \cdot 10^{-5}$	$(6.01 \pm 0.18) \cdot 10^2$
$1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.0 \cdot 10^{-4}$	$1.83 \cdot 10^{-4}$	$(9.08 \pm 0.17) \cdot 10^2$
$1.5 \cdot 10^{-4}$	$1.5 \cdot 10^{-4}$	$2.65 \cdot 10^{-4}$	$(1.24 \pm 0.02) \cdot 10^3$
$2.0 \cdot 10^{-4}$	$2.0 \cdot 10^{-4}$	$3.42 \cdot 10^{-4}$	$(1.39 \pm 0.04) \cdot 10^3$
$3.0 \cdot 10^{-4}$	$3.0 \cdot 10^{-4}$	$4.83 \cdot 10^{-4}$	$(1.48 \pm 0.03) \cdot 10^3$
$4.0 \cdot 10^{-4}$	$4.0 \cdot 10^{-4}$	$6.13 \cdot 10^{-4}$	$(1.69 \pm 0.08) \cdot 10^3$
$4.0 \cdot 10^{-4}$	$6.0 \cdot 10^{-4}$	$7.44 \cdot 10^{-4}$	$(2.07 \pm 0.10) \cdot 10^3$
$4.0 \cdot 10^{-4}$	$8.0 \cdot 10^{-4}$	$8.87 \cdot 10^{-4}$	$(2.51 \pm 0.06) \cdot 10^3$

Tab.IX: Bestimmung von τ^{*-1} bei verschiedenen Konzentrationen von Calcimycin (A) und Ca^{++}, pH 6.50, T=20°C.

Die Geschwindigkeitskonstante k_{on}^* ist jedoch noch pH-abhängig. Analog zur modellmäßigen Auswertung der Komplexbildungskinetik mit Mg^{++} ist auch hier anzunehmen, daß Ca^{++} nur an das Calcimycin im einfach deprotonierten protolytischen Zustand bindet. Die pH-unabhängige Geschwindigkeitskonstante wird mit Glg.(29) berechnet. Die Berechnung ergibt:

$$k_1 = (1.8 \pm 0.3) \cdot 10^7 \ M^{-1} \ s^{-1}$$

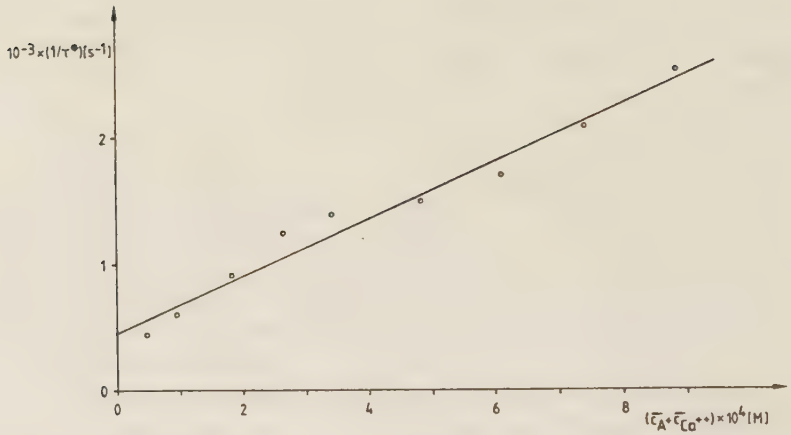


Abb.48 Abhängigkeit von τ^{*-1} von der Summe der freien Konzentrationen von Calcimycin und Ca^{++}.

$$k_{-1} = 460 \pm 90\ s^{-1}$$

Der angegebene Fehler ist die größte absolute Abweichung der berechneten Geraden in Abb.48 von den Meßpunkten.

Die Geschwindigkeitskonstante für die Komplexbildung ist somit etwa 30-mal größer als die für die Bildung des Magnesiumkomplexes. Anhand der kinetischen Parameter läßt sich eine Selektivität der Komplexbildung von Mg^{++} gegenüber Ca^{++} zeigen. Die Geschwindigkeitskonstante für den Zerfall des Komplexes ist bei Ca^{++} um etwa einen Faktor 8 größer als bei Mg^{++}.

7. Diskussion der Ergebnisse der Gleichgewichts- untersuchungen und der kinetischen Messungen

In diesem Abschnitt werden die Meßergebnisse diskutiert, die die Gleichgewichtsuntersuchungen der Protolyse, der Komplexbildung von Calcimycin mit Erdalkaliionen und die kinetischen Untersuchungen in einem 30% Wasser in Methanol-Gemisch (Gew./Gew.) ergaben. Der im Rahmen dieser Arbeit bestimmte pK_{AH}-Wert der Protolyse stimmt gut mit den in der Literatur veröffentlichten Werten überein. Eine Betrachtung der Abhängigkeit der des pK_{AH}-Wertes von der Lösungsmittelzusammensetzung dieser Protolyse zeigt, daß der bestimmte Wert sehr gut in diese Abhängigkeit paßt (siehe Tab.X).

Wasser/Methanol-Gemisch(Gew./Gew.)	pK_{AH}
0/100	10.37 ± 0.06^{a}
5/95	9.43^{b} 9.37^{b}
10/90	8.86^{c} 8.69^{b}
20/80	7.84^{b} 7.85^{b}
30/70	7.34 ± 0.09 7.0 ± 0.2^{a}
35/65	7.19^{b} 7.24^{b}
50/50	6.80^{b} 6.84^{b}
65/35	6.30^{b} 6.33^{b}

Tab.X: Abhängigkeit des pK_{AH}-Wertes von der Lösungsmittelzusammensetzung Zitate: a - /50/, b - /51/, c - /52/.

Kauffman,F.; Taylor,R.W. und Pfeiffer,D.R. bestimmten den pK_{AH}-Wert von an Dimyristoylphosphatidylcholin-Vesikeln gebundenem Calcimycin mit photometrischen Titrationen /51/. Der von ihnen bestimmte pK_{AH}-Wert (7.85±0.05 bei 25°C) liegt nahe bei dem Wert, der für die Protolyse in einem 30% Wasser in Methanol-Gemisch (7.34±0.09 bei 25°C) in dieser Arbeit angegeben wird. Die Annahme, dieses Gemisch als Modellmedium für die Wasser/Membran-Grenzschicht zu betrachten, war somit sinnvoll.

Die Gleichgewichtsuntersuchungen zur Komplexbildung von Calcimycin mit Mg^{++} und Ca^{++} in einem 30% Wasser in Methanol-Gemisch (Gew./Gew.) führen zu dem folgendem allgemeinen Resultat: Zwischen dem einfach negativ geladenen Calcimycin und einem Mg^{++} bzw. einem Ca^{++} bildet sich bevorzugt ein 1:1-Komplex. 2:1-Komplexe zwischen zwei Calcimycinmolekülen und einem Erdalkaliion konnten nicht festgestellt werden. Die scheinbaren Gleichgewichtskonstanten der Komplexe mit Mg^{++} und Ca^{++} unterscheiden sich im Rahmen der Fehlergrenzen nicht. Es läßt sich somit keine Selektivität in bezug auf die scheinbaren Gleichgewichtskonstante für die Komplexbildung zwischen Calcimycin mit Mg^{++} gegenüber Ca^{++} feststellen. Unter Berücksichtigung der protolytischen Gleichgewichte des Calcimycins und der Komplexbildung von $AHMe^{++}$ ergibt sich das in Abschn.6.1.3. dargestellte Reaktionsmodell (Glg.VIII). Der Betrag der hier bestimmten pK_1-Werte stimmt recht gut mit denen von D. Boyd überein/50/56/, welche mit potentiometrischen Methoden erhalten wurden (siehe Tab.XI).

Zur Untersuchung der Reaktionsmechanismen ist die Anwendung schneller Untersuchungsmethoden für die Ermittlung der Geschwindigkeitskonstanten erforderlich. Die Interpretation

Komplex	pK_1 [a]	pK_1
AMg^+	4.4 ± 0.4	3.97 ± 0.18
ACa^+	4.1 ± 0.1	4.09 ± 0.45

Tab.XI: Vergleich der experimentell bestimmten pK_1-Werte mit Literaturwerten, Medium: 30% Wasser in Methanol-Gemisch, T=25°C, Zitat: a - /50/56/.

der kinetischen Messungen führt zu einer Erweiterung des Reaktionsmodells für die Komplexbildung von Calcimycin mit Ca^{++}. Für die Komplexbildung mit Mg^{++} genügt das oben angeführte Reaktionsschema (Glg.VIII) zur Beschreibung der experimentellen Daten. Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebene pH-Abhängigkeit der Gleichgewichtskonstanten und der Komplexbildungsgeschwindigkeit kann eindeutig der Komplexbildung zugeordnet werden. Es konnten hier keine Hinweise für eine pH-Abhängigkeit der Zerfallsgeschwindigkeitskonstanten (k_{-1} = 60 s^{-1}) gefunden werden. Bestimmungen der Geschwindigkeitskonstanten für die Bildung von Mg^{++}-Komplexen ergaben, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt die Substitution der Wassermoleküle der inneren Hydratationshülle ist/41/. So wurde z.B. für die Komplexbildung von $Oxin^-$ (8-Hydroxy-chinolin) im deprotonierten Zustand mit Mg^{++} eine Geschwindigkeitskonstante von $3.8 \cdot 10^5$ M^{-1} s^{-1} bestimmt/41/. Die Berechnung der Reaktionskonstante der Substitution der inneren Hydratationshülle beim Mg^{++} ergab 10^5 s^{-1} (siehe Abb.49). Die Geschwindigkeitskonstante

für die Komplexbildung von Calcimycin mit Mg^{++} beträgt $5.5 \cdot 10^5\ M^{-1}\ s^{-1}$. Da diese Geschwindigkeitskonstante dieselbe Größenordnung hat wie die zur zur Bildung der oben erwähnten Mg^{++}-Komplexe (z.B. $Oxin^-/Mg^{++}$), wird angenommen, daß auch hier die Substitution der inneren Hydratationshülle für Mg^{++} geschwindigkeitsbestimmend für die Bildung des 1:1-Komplexes von Calcimycin mit Mg^{++} ist.

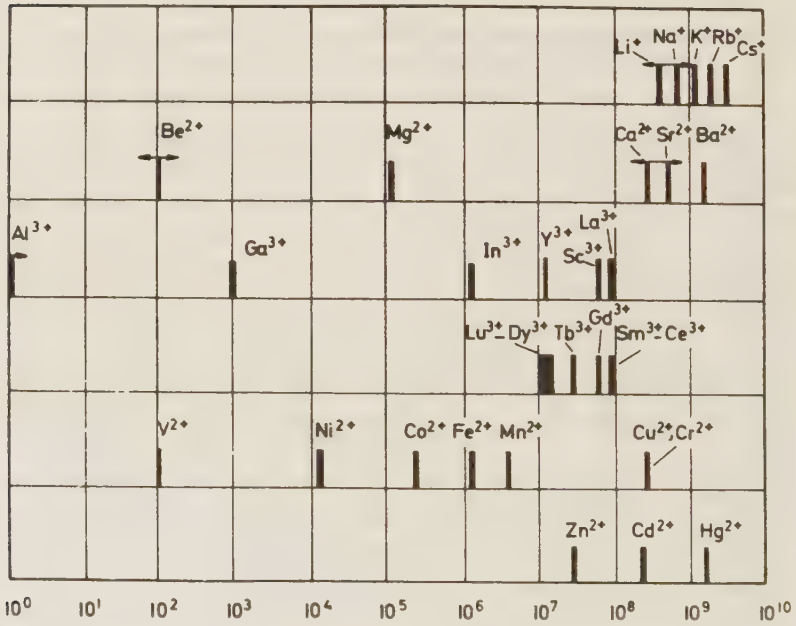


Abb.49:Reaktionsraten für die Substitution der inneren Hydratationshülle für einige Kationen /41/.

Die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung des Kom-

plexes von $Oxin^-$ mit Ca^{++} ist $\geq 10^8\ M^{-1}\ s^{-1}$ /41/. Die berechnete Reaktionskonstante für die Substitution der Wassermoleküle beträgt für Ca^{++} etwa $3 \cdot 10^8\ s^{-1}$ (siehe Abb.49). In diesem Fall haben beide Konstanten dieselbe Größenordnung. Die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung des ACa^+-Komplexes beträgt $1.8 \cdot 10^7\ M^{-1}\ s^{-1}$. Das bedeutet, daß für die Komplexbildung die Substitution der Wassermoleküle nicht geschwindigkeitsbestimmend sein kann. Vielmehr muß ein zusätzlicher Reaktionsschritt existieren, der um etwa einen Faktor 10 langsamer ist als die Solvatsubstitution. Für eine mögliche Deutung dieses langsameren Reaktionschrittes könnte man eine Konformationsänderung des Calcimycins im Verlauf der Komplexbildungsreaktion annehmen, die notwendig ist, um das Ca^{++} vollständig zu umschließen. Eine Ursache für diese Konformationsänderung könnte der größere Ionendurchmesser des Ca^{++} gegenüber dem Mg^{++} sein. Der Ionenradius für ein Ca^{++} ist 99 pm und der eines Mg^{++} 66 pm/55/. Diese Interpretation stimmt mit den Vorstellungen von Pfeiffer und Deber überein, die für die Bildung des A_2Ca-Komplexes eine Konformationsänderung des Calcimycins im Sinne einer Aufweitung annahmen /40/. Durch Einführen eines zusätzlichen Reaktionsschrittes kann die Komplexbildung von Calcimycin mit Ca^{++} mit dem folgendem Reaktionsschema dargestellt werden:

$$H^+ + A^- + Me^{++} \underset{k_{21}}{\overset{k_{12}}{\rightleftharpoons}} \overline{AMe^+} + H^+ \underset{k_{32}}{\overset{k_{23}}{\rightleftharpoons}} AMe^+ + H^+ \qquad \text{(XI)}$$

$$K_{AH} \quad \Big\| \quad AH + Me^{++}$$

In diesem Reaktionsmodell hat $\overline{AMe^+}$ die Bedeutung eines Zwischenzustandes für die Bildung von AMe^+. k_{12} ist die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung von $\overline{AMe^+}$ und k_{21} die Zerfallsgeschwindigkeitskonstante des vorgelagerten Gleichgewichts. k_{23} ist die Geschwindigkeitskonstante für die Bildung von AMe^+ und k_{32} seine Zerfallsgeschwindigkeitskonstante. Die Auswertungen der Temperatur-Sprung-Messungen zeigten, daß die Reaktion mit einer Relaxationszeit bestimmt werden kann. Es wird deshalb angenommen, daß die Bildung von AMe^+ aus $\overline{AMe^+}$ der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt ist, der dem schnelleren, vorgelagertem Gleichgewicht nachfolgt. Im obigen Reaktionsschema (Glg.XI) wird diese Interpretation durch den zweiten Reaktionsschritt angedeutet. Nimmt man an, daß $k_{21} >> k_{23}$ ist, so ist die Relaxationszeit des Vorgleichgewichts beträchtlich kürzer als die des zweiten, geschwindigkeitsbestimmenden Reaktionsschritts. Unter der Voraussetzung, daß $k_{12}(\bar{c}_A + \bar{c}_{Ca}{}^{++}) << k_{21}$ ist, was im allgemeinen einem niedrigen Wert für k_{12}/k_{21} entspricht, können die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_{-1} durch die folgenden zwei Gleichungen ausgedrückt werden:

$$k_1 = \frac{k_{12}\, k_{23}}{k_{21}} \qquad (32) \qquad\qquad k_{-1} = k_{32} \qquad (33)$$

Die im Rahmen dieser Arbeit experimentell ermittelte Zerfallsgeschwindigkeitskonstante für den Zerfall von ACa^+ in 30% Wasser in Methanol (Gew./Gew.) ist etwa 8-mal größer als die für den AMg^+-Komplex. Boyd stellte fest, daß der direkte Zerfall des ACa^+-Komplexes auch in Methanol etwa 7-mal schneller ist als der des AMg^+-Komplexes. Dessen indirekter Zerfall über die Bildung von $AHMe^{++}$ ist ungefähr

6-mal schneller /50/. Es besteht somit eine gute Übereinstimmung der Ergebnisse .

Welche Bedeutung haben diese Ergebnisse für den Transport durch Membranen? Der Vergleich der Messungen zur Bestimmung der protolytischen Gleichgewichtskonstante mit Literaturdaten bestätigt die Annahme, das 30% Wasser in Methanol-Gemisch(Gew./Gew.) als Modellmedium für die Wasser/Membran-Grenzschicht zu betrachten. Während aufgrund der Bestimmung der Gleichgewichtskonstanten keine Selektivität der Komplexbildung von Calcimycin mit Mg^{++} gegenüber Ca^{++} gefunden wurde, so ergaben die kinetischen Messungen eine Selektivität hinsichtlich der Zerfallsgeschwindigkeiten der 1:1-Komplexe. Ist die Dissoziation der Komplexe beim Transport der Kationen durch eine Membran geschwindigkeitsbestimmend, so kann die Selektivität dieses Transportes von Mg^{++} gegenüber Ca^{++} durch das Verhältnis der Zerfallsgeschwindigkeitskonstanten angegeben werden. Die Meßergebnisse zeigen, daß diese Konstante 8-mal für Ca^{++} größer ist als für Mg^{++}. Somit kann durch die Angabe des Verhältnisses der Zerfallsgeschwindigkeitskonstanten für die Komplexbildung des Calcimycin mit Mg^{++} und Ca^{++} die Selektivität hinsichtlich des Transportes durch eine Membran befriedigend dargestellt werden.

8. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertationsarbeit wurden zwei Themenbereiche bearbeitet: 1. Konstruktion und Aufbau einer Drei-Komponenten-Stoppes flow-Apparatur, 2. Untersuchung der Komplexbildungsmechanismen des Ionophores Calcimycin mit Mg^{++} und Ca^{++}.

Die Drei-Komponenten-Stopped flow-Apparatur ermöglicht kinetische Messungen von Reaktionen in flüssiger Phase im Zeitbereich von Millisekunden und die Beobachtung von zwei Reaktionsgemischen. Diese Meßmöglichkeit wird mit zwei hintereinander installierten Mischkammer/Beobachtungskammer-Einheiten realisiert. Allgemein kann man die Anwendbarkeit der Apparatur wie folgt beschreiben: Nach dem Mischen von zwei Lösungen in der ersten Mischkammer, kann das entstehende Reaktionsgemisch mit einer dritten Lösung in der zweiten Mischkammer gemischt werden. Zwei unabhängige Detektionssysteme gestatten die gleichzeitige Beobachtung der Absorptions- und der Fluoreszenzeigenschaften von beiden Reaktionsgemischen. Es besteht die Möglichkeit das erste Reaktionsgemisch verzögert mit der dritten Lösung zu mischen. Die vorwählbare Verzögerungszeit kann minimal etwa 0.02 s und maximal 200 s betragen und gestattet somit eine Mischung der dritten Lösung mit dem ersten Reaktionsgemisch in der zweiten Mischkammer zu einem genau definierten Zeitpunkt nach der Beobachtung des ersten Reaktionsgemisches. Die Totzeit der Apparatur wurde mit einem geeigneten Testsystem bestimmt und beträgt minimal 0.004 s. Die zeitabhängige Bildung der Reaktionsprodukte kann entweder gleichzeitig oder unabhängig voneinander mit Fluoreszenzlicht- und Absorptionsdetektionen verfolgt werden.

Der zweite Teil der Dissertationsarbeit beschäftigt sich mit mit dem Komplexbildungsmechanismus des Membrancarriers Calcimycin mit Mg^{++} und Ca^{++} in homogener Lösung (30% Wasser in Methanol-Gemisch (Gew./Gew.). Es wurden die scheinbaren Gleichgewichtskonstanten der Komplexe bei verschiedenen pH-Werten mit spektralphotometrischen Titrationen bestimmt. Die Messungen zeigen, daß nur der 1:1-Komplex in diesem Medium wesentlich besetzt wird. Die Interpretation der pH-Abhängigkeit der scheinbaren Gleichgewichtskonstanten ergibt, daß nur der einfach deprotonierte Zustand des Calcimycins die Erdalkaliionen koordiniert. Die pH-unabhängigen pK-Werte der Komplexbildung betragen 4.09 ± 0.45 für den 1:1-Ca^{++}-Komplex und 3.97 ± 0.18 für den 1:1-Mg^{++}-Komplex. Beide Werte sind im Rahmen der Fehlergrenzen gleich. Es ergibt sich somit in bezug auf die scheinbaren Gleichgewichtskonstanten kein Hinweis auf eine Ca^{++}/Mg^{++}-Selektivität. Für die Protolyse von Calcimycin in Abwesenheit von Erdalkaliionen wurde mit spektralphotometrischen pH-Titrationen in demselben Medium ein pK_{AH}-Wert von 7.34 ± 0.09 gefunden.

Kinetische Messungen erlauben, eine Aussage über den Komplexbildungsmechanismus des Calcimycins mit beiden Erdalkaliionen machen zu können. Dabei wird die Stopped flow-Methode für die Untersuchung der zeitlichen Abhängigkeit der Komplexbildungsreaktion mit Mg^{++} und die Temperatur-Sprung-Methode für die Untersuchung der Komplexbildung des Calcimycins mit Ca^{++} angewendet. Die Messungen ergeben für die Geschwindigkeitskonstante der Komplexbildung mit Ca^{++} einen um etwa Faktor 30 höheren Betrag: $k_1\ (AMg^+) = (5.5+1.3)\cdot10^5\ M^{-1}\ s^{-1}$, $k_1\ (ACa^+) = (1.8+0.3)\cdot10^7\ M^{-1}\ s^{-1}$. Für die Komplexbildung von AMg^+ ist die Substitution der Solvatmoleküle der inneren Koordinationssphäre des Mg^{++}

geschwindigkeitsbestimmend. Für die Bildung des 1:1-Ca^{++}-Komplexes wird ein Zwischenzustand eingeführt. Es wird angenommen, daß der Übergang von diesem Zwischenzustand in den endgültigen ACa^{+}-Komplex der geschwindigkeitsbestimmende Reaktionsschritt ist. Der Zwischenzustand des Calcimycins könnte eine Konformationsänderung des Calcimycins während der Bildung des 1:1-Ca^{++}-Komplexes darstellen. Die Geschwindigkeitskonstanten für die Dissoziation der 1:1-Komplexe sind pH-unabhängig und für Ca^{++} etwa 8-mal größer als für Mg^{++}.

Das für diese Untersuchungen verwendete Medium dient als Modellmedium für eine Wasser/Membran-Grenzschicht. Die aus den Gleichgewichtsuntersuchungen und den kinetischen Messungen sich ergebenden Schlußfolgerungen für den Erdalkaliionentransport durch Calcimycin in Membranen werden diskutiert.

9.Literaturverzeichnis

/1/ Hartridge,H.; Roughton,F.J.W.; Proc. Roy. Soc. (London), A1923, 104, S.376-394

/2/ Hartridge,H.; Roughton,F.J.W.; Proc. Roy. Soc. (London), A1923, 104, S.395-430

/3/ Roughton,F.J.W.; Millikan,G.A.; Proc. Roy. Soc. (London), A1936, 155, S.258-292

/4/ Gerischer,H.; Heim,W.; Zeitschrift für physikalische Chemie, 1965, 46, S.345-352

/5/ Owens,G.D.; Margerum,D.W.; Analytical chemistry, 1980, 52/1, S.91A-106A

/6/ Gerischer,H.; Heim,W.; Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie, 1967, 71/9/10, S.1040-1046

/7/ Gerischer,H.; Holzwarth,J.; Seifert,D.; Strohmaier,L.; Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie, 1969, 73/10, S.952-955

/8/ Gerischer,H.; Holzwarth,J.; Seifert,D.; Strohmaier,L.; Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie, 1972, 76/1, S.11-16

/9/ Owens,G.D.; Margerum,D.W.; Analytical chemistry, 1980, 52/1, S.91A-106A

/10/Chance,B.; J. Franklin Inst., 1940, 229, S.455-476, S.613-640, S.737-766

/11/Hiromi,K.; Kinetics of fast enzyme reactions, 1979, S.75-117, John Wiley & Sons, New York

/12/Calbiochem GmbH, Biologics, Vol.5/1, Antibiotic A 23187

/13/Grell,E.; Funck,Th.; Eggers,F.; Structure and dynamic properties of ion specific antibiotics, in: Eisenman,G.; Membranes, 1975, Vol.3, S.1-126, Dekker, New York

/14/Hagen,G.; Poggendorffs Ann., 1839, 46; Pouiseuille, Comptes Rendus, 1840, 11; Pouiseuille, Comptes Rendus, 1841, 12

/15/Jaworski,B.M.; Detlaf,A.A.; Physik griffbereit, 1972, S.317, Vieweg - Verlag, Braunschweig

/16/Rödel,H.; Hydrodynamik, 1978, S.84, Carl Hanser Verlag

/17/Prandtl; Strömungslehre, 1965, S.175-203, Vieweg-Verlag, Braunschweig

/18/Rödel,H.; Hydrodynamik, 1978, S.92, Carl Hanser Verlag

/19/Bohl,W.; Wagner,W.; Technische Strömungslehre - Aufgaben und Lösungen, S.65, Vogel - Verlag

/20/Frost,A.A.; Pearson,R.G.; Kinetik und Mechanismen homogener chemischer Reaktionen, 1964, S.173, Verlag Chemie

/21/ebenda, S.13

/22/Benson,S.W.; The Foundations of chemical Kinetics, S.30, Mc Graw-Hill Book Company Inc., New York, Toronto, London, 1960

/23/Frost,A.A.; Pearson,R.G.; Kinetik und Mechanismen homogener chemischer Reaktionen, 1964, S.16, Verlag Chemie

/24/Katalog der Firma Plastic Omnium

/25/Kalide,W.; Technische Strömungslehre, S.82, Tab.96, Carl Hanser Verlag

/26/ebenda, S.70, Bild 60

/27/Rödel,H.; Hydrodynamik, 1978, S.103, Tab.103, Carl Hanser Verlag

/28/Marquardt,D.L.; J. SIAM 11, 1963, S.431-441

/29/Provencher,S.W.; J. Chem. Soc., Vol.64, S.2772, 1976

/30/Provencher,S.W.; Biophys. J., Vol.16, S.27-41, 1976

/31/Pfeiffer,D.R.; Taylor,R.W.; Lardy,H.A.; Annals New York Academy of Sciences, 307, S.402-423, 1978

/32/Wulf,J.; Pohl,W.G.; Biochim. Biophys. Acta, 465, S.471, 1977

/33/Pohl,W.G.; Kreikenbohm,R.; Seuwen,K.; Z. Naturforschung,

35c, S.562, 1980

/34/Caswell,A.H.; Pressman; Biochem. and Biophys. Research Communications, Vol. 49, No. 1, S.292-298

/35/Case,G.D.; Vanderkooi,J.M.; Scarpa,A.; Archives of Biochemistry and Biophysics, 162, S.174-185, 1974

/36/Reprint from the Journal of the American Chemical Society, 96, S.1932, 1974. Copyright 1974 by the American Chemical Society and reprinted by permission of the copyright owner.

/37/Smith,G.D.; Duax,W.L.; Journal of the American Society, S.1578-1580, 1976

/38/Deber,C.M.; Pfeiffer,D.R.; Biochemistry, Vol.15, Nr.1, S.132-141, 1976

/39/Pfeiffer,D.R.; Lardy,H.A.; Biochemistry, Vol.15, Nr.5, S.935-943, 1976

/40/Pfeiffer,D.R.; Deber, Ch.M.; FEBS LETTERS, Vol.105, No.2, S.360-364, Sept. 1979

/41/Diebler,H.; Eigen,M.; Ilgenfritz,G.; Maaß,G.; Winkler,R.; Pure and Applied Chemistry, Kinetics and Mechanism of Reactions of Main Group Metal Ions with Biological Carriers, Vol.20 Reprint, S.93-115, 1969, London

/42/Rorabacher,D.B.; Mac Kellar,F.R.; Bonavita,M.; Analytical Chemistry, Vol.43, Nr.4, S.561-573, 1971

/43/Mager,G.; Dissertationsarbeit, MPI f. Biophysik, Frankfurt/M., 1983

/44/Mager,G.; Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt/Main

/45/Stelzer,E.; Schmid,A.; Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt/Main

/46/Hellwig,D.; Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen; Mager,G.; Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt/Main

/47/Schmid,A.; Krause,G.; Max-Planck-Institut für Biophysik, Fankfurt/Main

/48/Winkler,R.; Kinetik und Mechanismus der Alkali- und Erdalkalimetallkomplexbildung in Methanol (Dissertationsarbeit), Göttingen-Wien, S.19, 1969

/49/Rittger,E.; Untersuchungen zum Bindungsmechanismus von Inhibitoren an das Metalloenzym Carboanhydrase (Diplomarbeit), MPI für Biophysik, Frankfurt/Main, S.25ff., 1982

/50/Boyd,D.W.; Dissertationsarbeit, Strasbourg, 1982 Albrecht-Gary,A.M.; Boyd,D.W.; Schwing,J.P.; Private Mitteilung

/51/Kauffman,R.F.; Taylor,R.W.; Pfeiffer,D.R.; Biochemistry, 21, S.2426-2435, 1982

/52/Private Kommunikation zwischen Juillard,J. und Boyd,D.W.

/53/Eigen,M.; De Maeyer,L; Technique of Organic Chemistry (Ed. A. Weissberger), Bd.VIIIb, S.895ff., 1963, Interscience, N.Y.

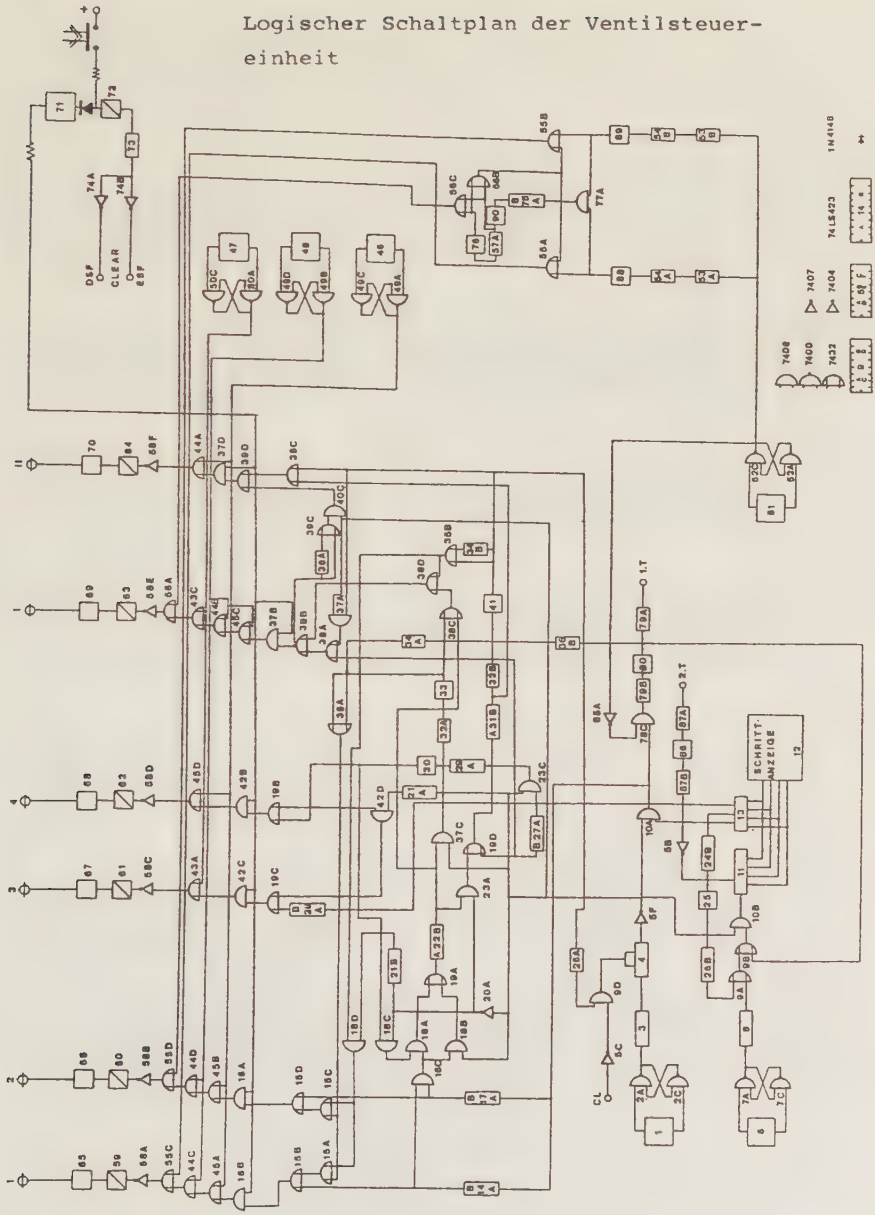
/54/Rabl,C.R.; Technische Biochemie, Dechema Monogr. N, Bd.71, S.187, 1973

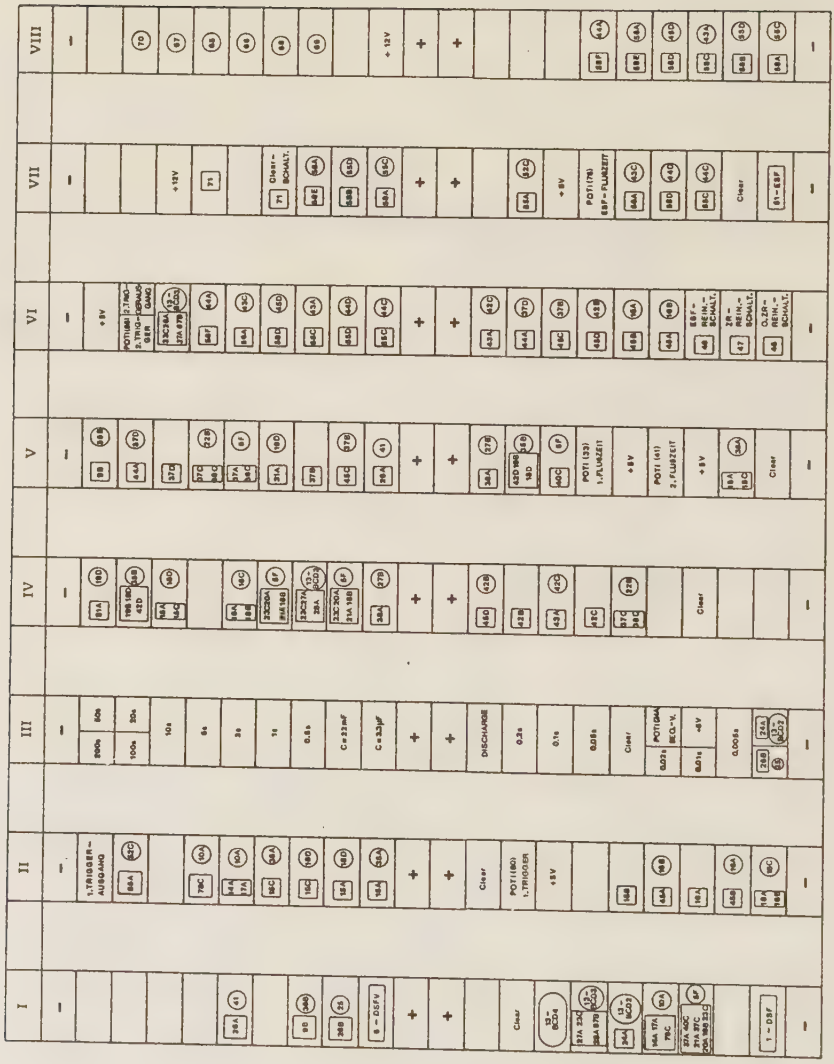
/55/Aylward,G.; Findlay,T.; Datensammlung Chemie, Verlag Chemie, Weinheim, 1975

/56/Krause,G.; Grell,E.; Albrecht-Gary,A.M.; Boyd,D.W.; Schwing,J.P.; Dynamic Aspects of Complex Formation and Dissociation between the Antibiotic A23187 and Alkaline Earth Cations, in: Transmembrane Ion Motions, 36e Internationale de la Societe de Chimie Physique, Paris, 1982, proceedings: Elsevier, Amsterdam, 1983

10. Anhang

Logischer Schaltplan der Ventilsteuer-
einheit



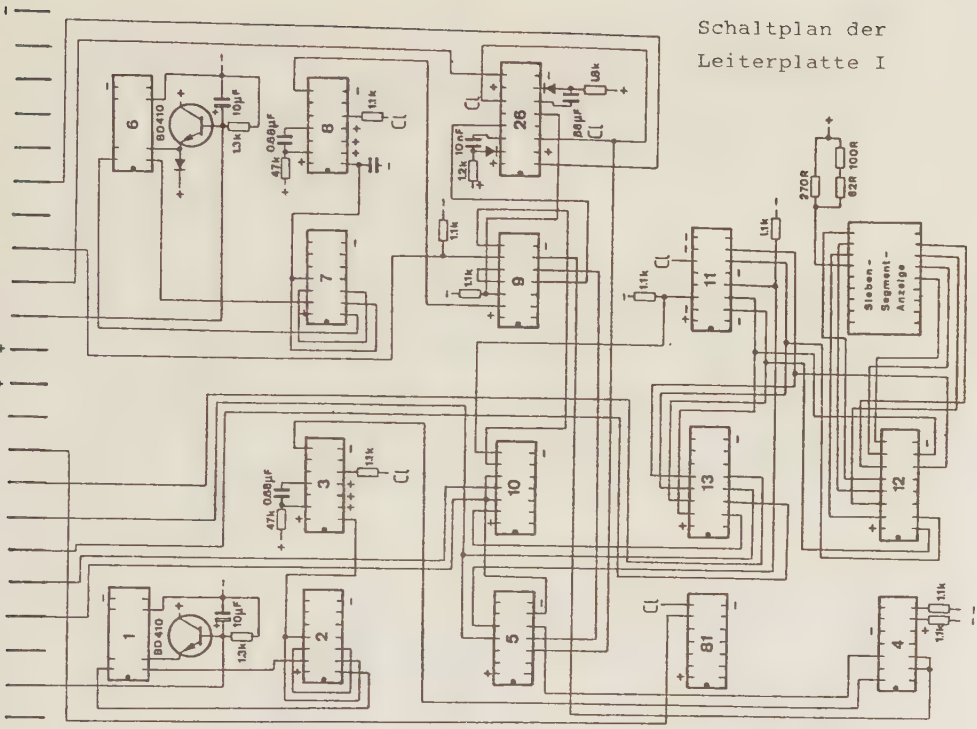


Anschlußplan für die Leiterplatten

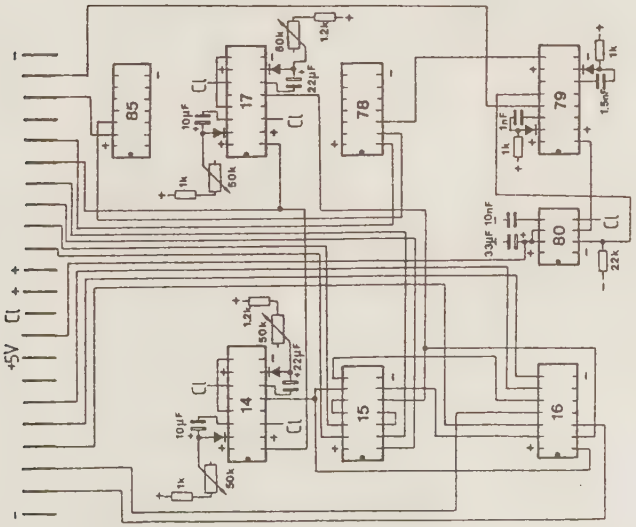
Eingang

Ausgang

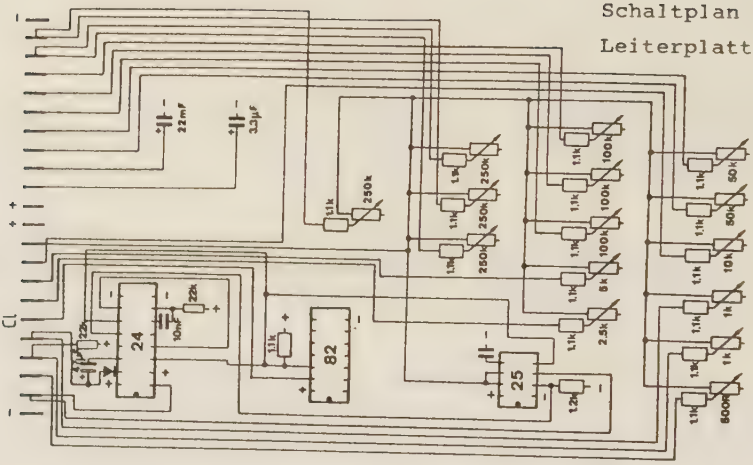
Schaltplan der Leiterplatte I



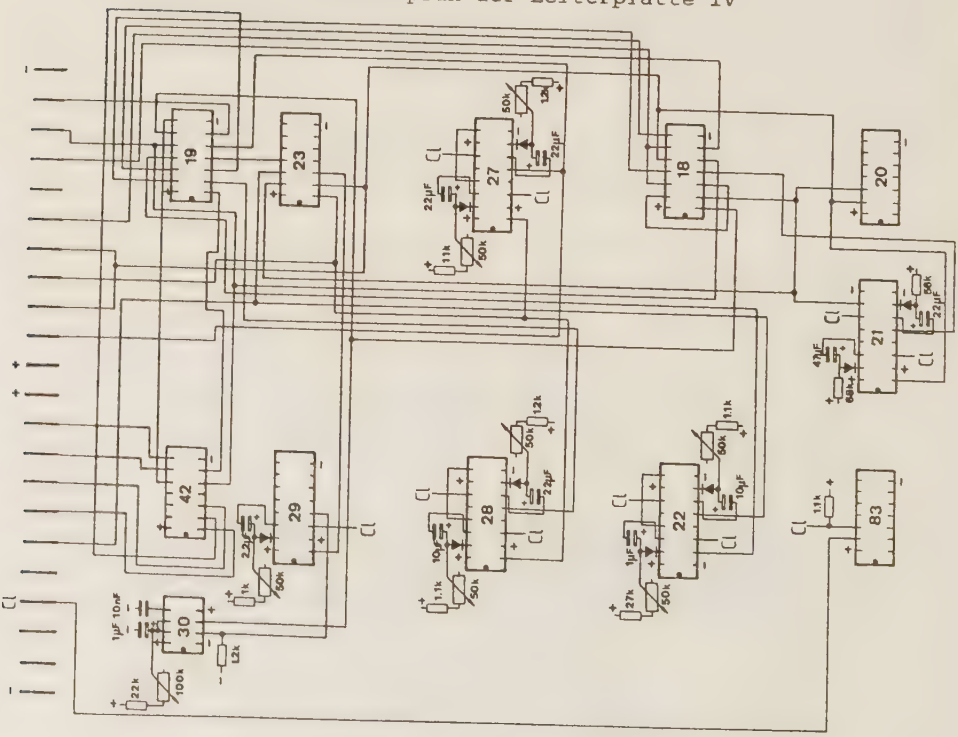
Schaltplan der Leiterplatte II



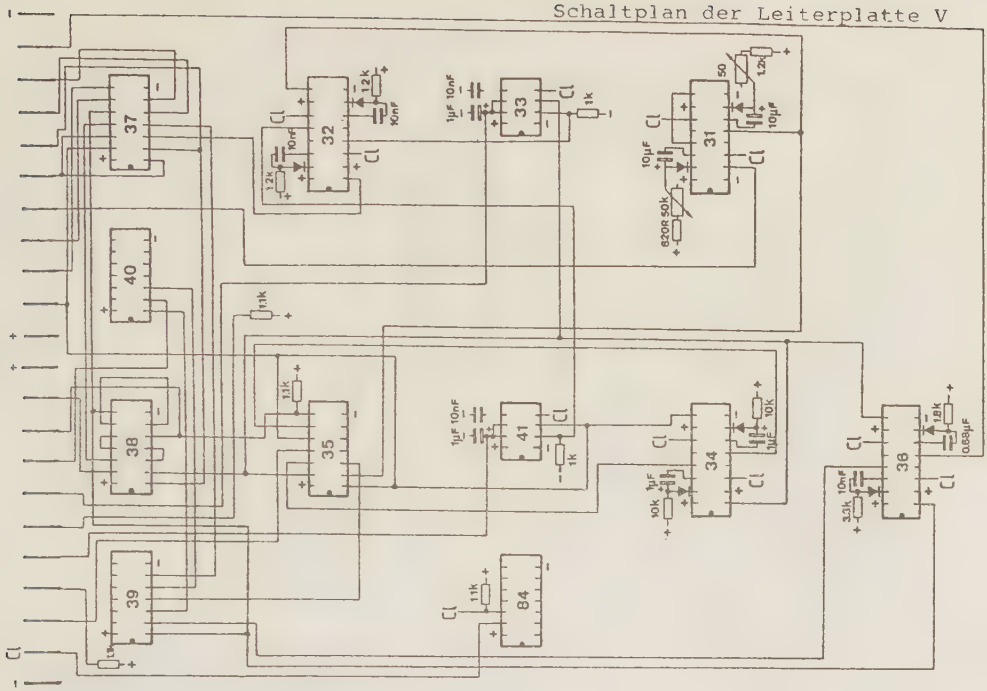
Schaltplan der Leiterplatte III



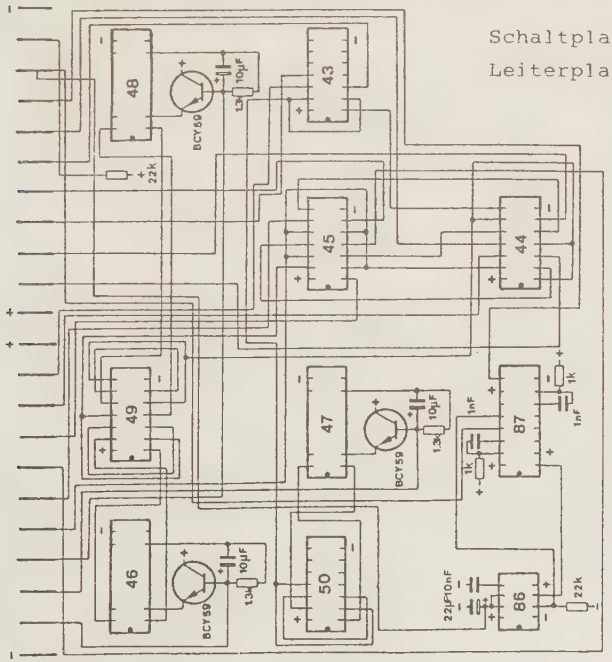
Schaltplan der Leiterplatte IV



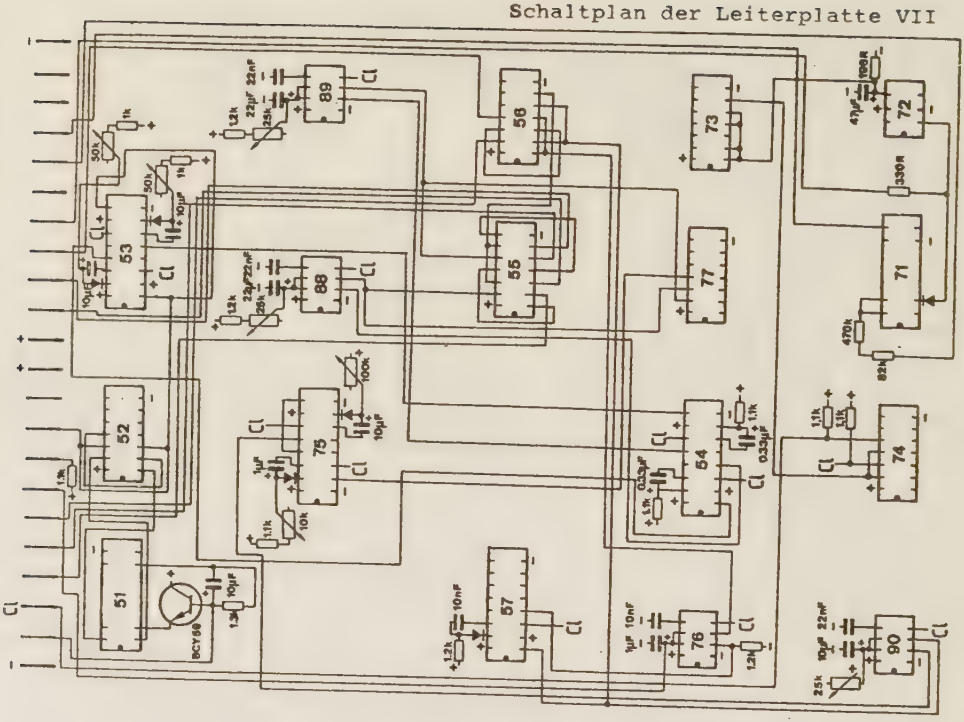
Schaltplan der Leiterplatte V



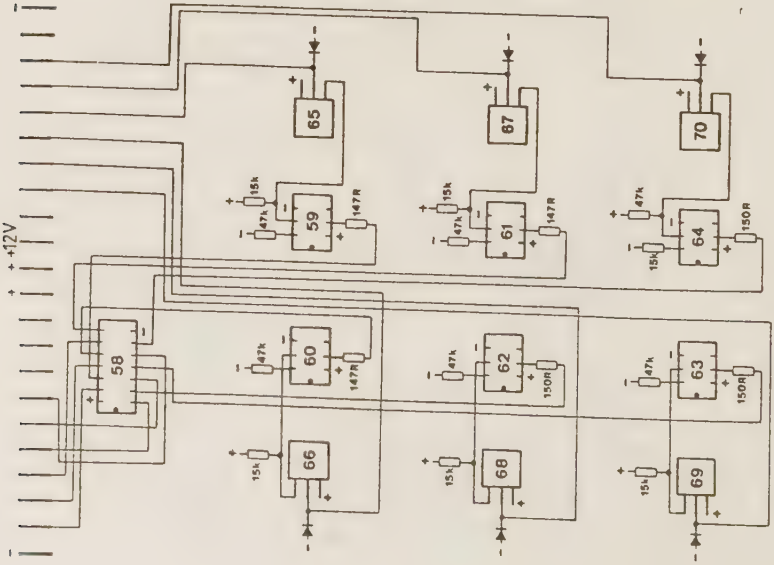
Schaltplan der
Leiterplatte VI



Schaltplan der Leiterplatte VII



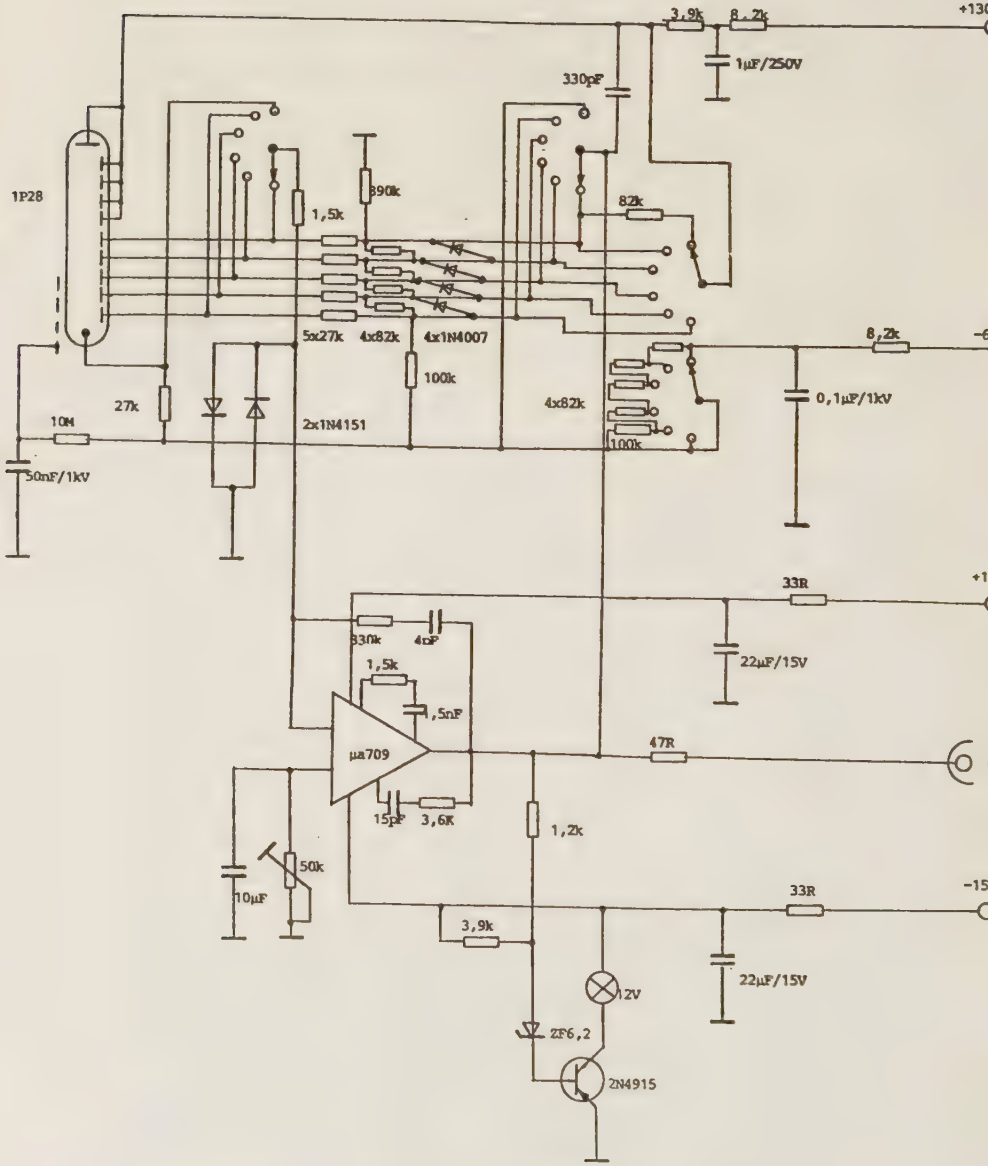
Schaltplan der Leiterplatte VIII



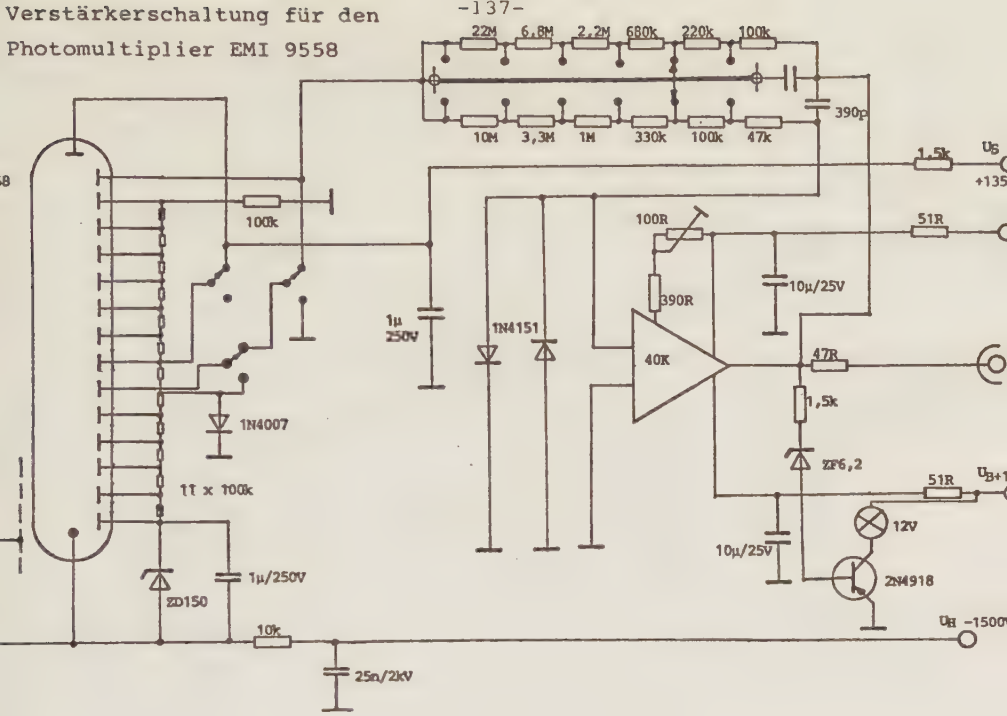
Liste der in den Schaltplänen angegebenen elektronischen Bausteine

1 - 7946	31 - 74LS423	61 - TIL111
2 - 7400	32 - 74LS423	62 - TIL111
3 - 74122	33 - NE555	63 - TIL111
4 - 7490	34 - 74LS423	64 - TIL111
5 - 7404	35 - 7432	65 - BDW74
6 - 7946	36 - 74LS423	66 - BDW74
7 - 7400	37 - 7408	67 - BDW74
8 - 74122	38 - 7432	68 - BDW74
9 - 7432	39 - 7432	69 - BDW74
10 - 7408	40 - 7408	70 - BDW74
11 - 74190	41 - NE555	71 - RELAIS
12 - 7447	42 - 7408	72 - TIL111
13 - 7442	43 - 7432	73 - 7413
14 - 74LS423	44 - 7432	74 - 7407
15 - 7432	45 - 7432	75 - 74LS423
16 - 7408	46 - 8009	76 - NE555
17 - 74LS423	47 - 8009	77 - 7408
18 - 7408	48 - 8009	78 - 7408
19 - 7432	49 - 7400	79 - 74LS423
20 - 7404	50 - 7400	80 - NE555
21 - 74LS423	51 - 8009	81 - 7407
22 - 74LS423	52 - 7400	82 - 7407
23 - 7408	53 - 74LS423	83 - 7407
24 - 74LS423	54 - 74LS423	84 - 7407
25 - NE555	55 - 7432	85 - 7404
26 - 74LS423	56 - 7432	86 - NE555
27 - 74LS423	57 - 74LS423	87 - 74LS423
28 - 74LS423	58 - 7404	88 - NE555
29 - 74LS423	59 - TIL111	89 - NE555
30 - NE555	60 - TIL111	90 - NE555

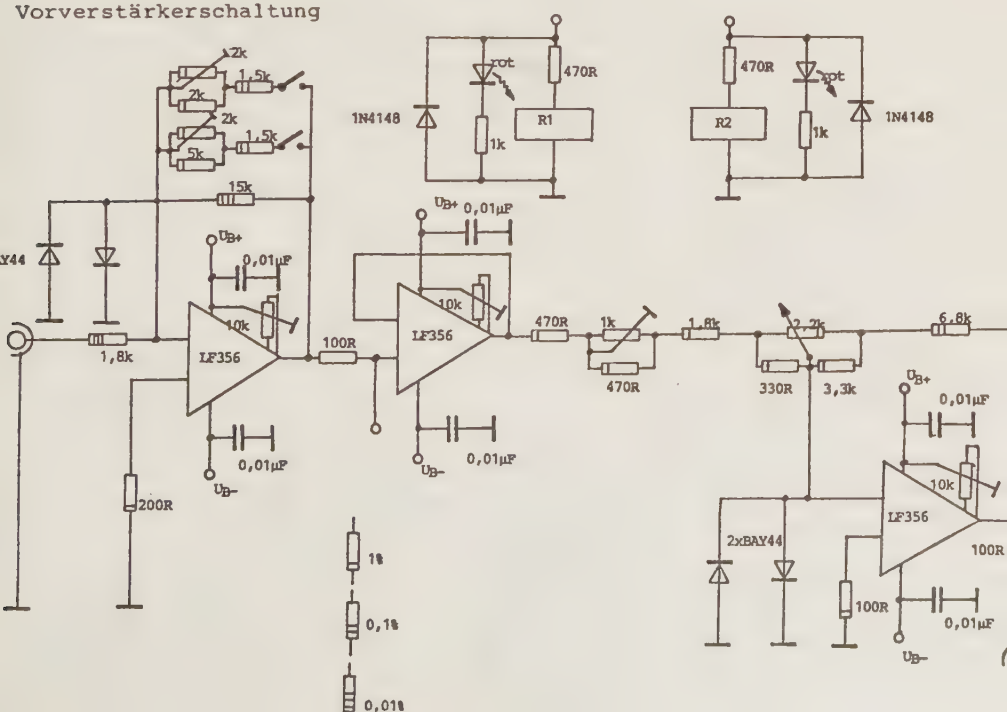
Verstärkerschaltung für den Photomultiplier 1P28



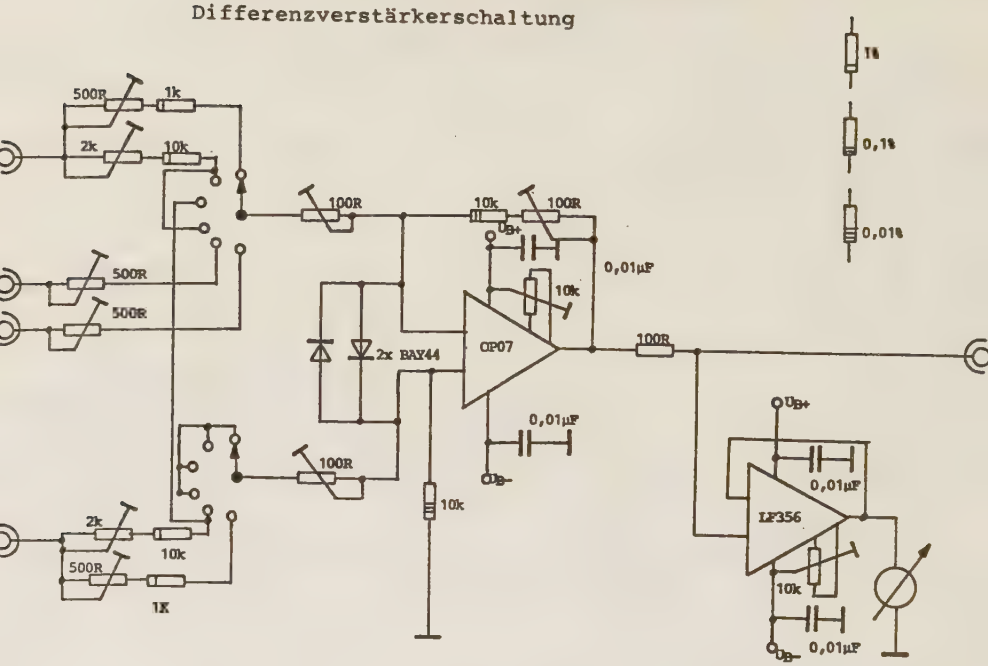
Verstärkerschaltung für den Photomultiplier EMI 9558



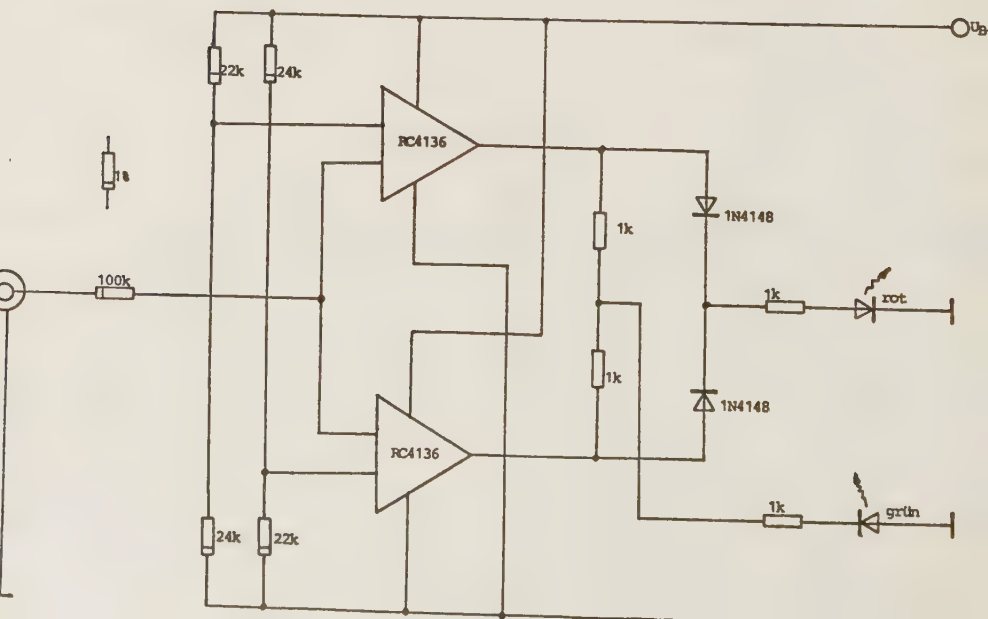
Photometrische Steuer- und Kontrolleinheit:
Vorverstärkerschaltung



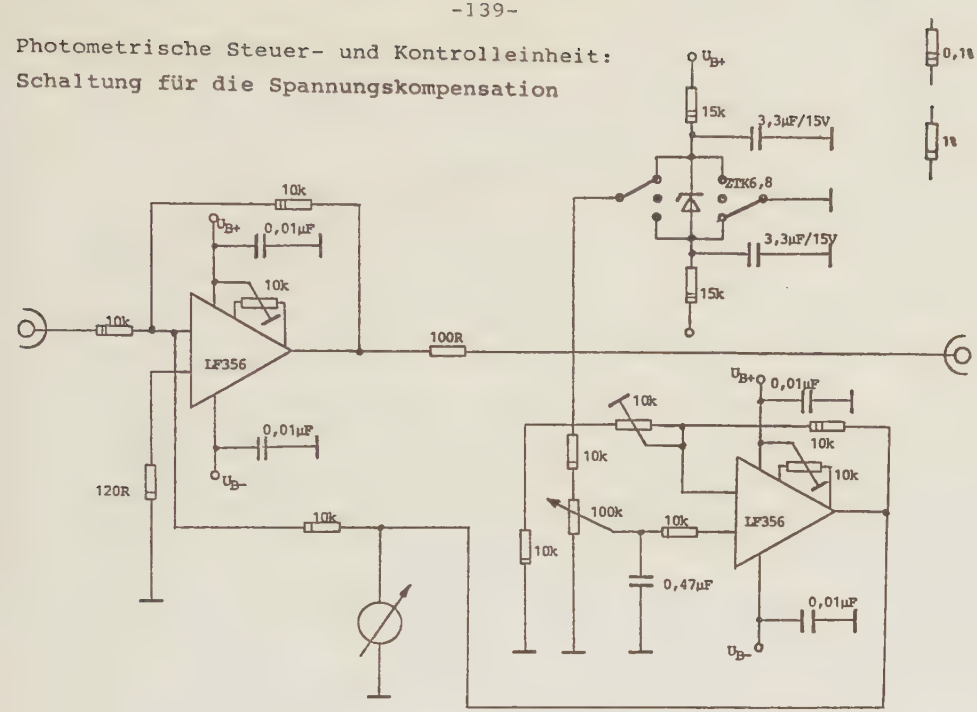
Photometrische Steuer- und Kontrolleinheit:
Differenzverstärkerschaltung



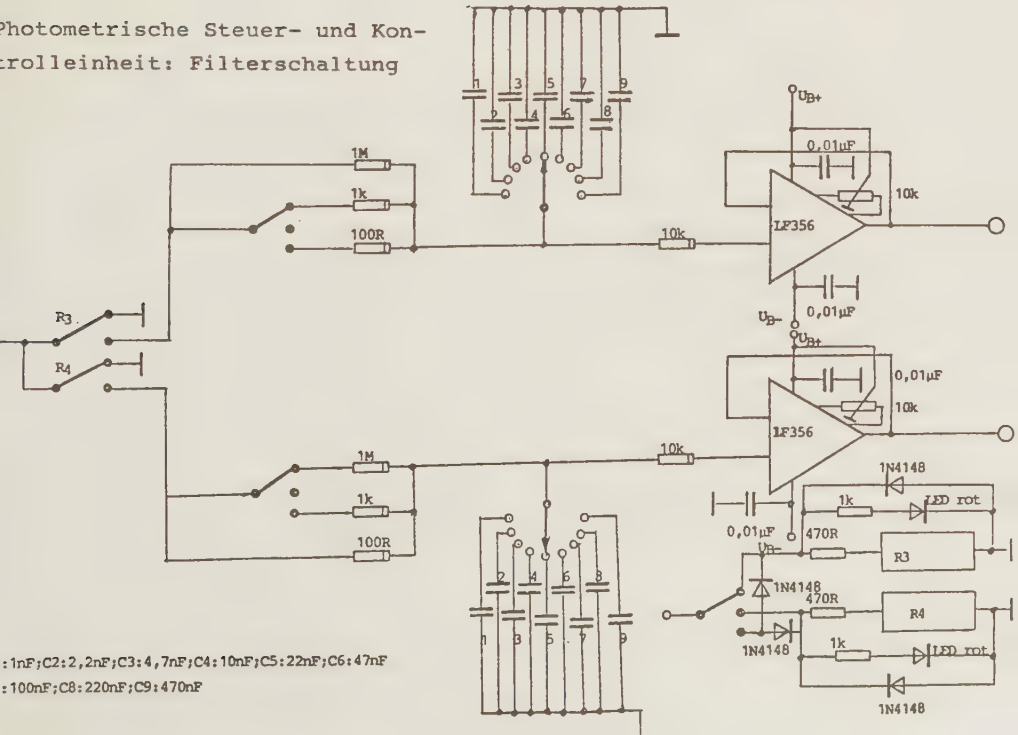
Photometrische Steuer- und Kontrolleinheit:
Schaltung für die Übersteuerungsanzeige



Photometrische Steuer- und Kontrolleinheit:
Schaltung für die Spannungskompensation



Photometrische Steuer- und Kontrolleinheit: Filterschaltung



:1nF;C2:2,2nF;C3:4,7nF;C4:10nF;C5:22nF;C6:47nF
:100nF;C8:220nF;C9:470nF

LEBENSLAUF

Name: Günther Krause
Geburtsdatum: 17.09.1951
Geburtsort: Leipzig

1958: Schulanfang

1966: Besuch der Erweiterten Oberschule (DDR). Beginn einer Ausbildung als Maschinenbauer. Während dieser Ausbildung wurden die folgenden Fächer gelehrt: Werkstoffkunde, Technisches Zeichnen, Fachkunde. Diese Ausbildung wurde aufgrund der Umsiedlung nach Frankfurt/Main 1968 abgebrochen.

1968: Umsiedlung in die Bundesrepublik Deutschland, nach Frankfurt/Main.

1968: Besuch des Gymnasiums an der Ernst-Reuter-Schule in Frankfurt/Main

1971: Abitur

1971: Bundeswehr

1974: Beginn des Physikstudiums an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt/Main

1979: Abschluss des Physikstudiums mit dem Diplom. Die Diplomarbeit wurde bei der DFVLR (Deutsche Forschungs- und Versuchsanstalt für Luft- und Raumfahrt) angefertigt. Das Thema der Diplomarbeit lautete: Untersuchung der Diffusion von NaOH während der Ätzung entlang von Teilchenspuren in bestrahlten Cellulosenitratfolien.

1984: Abschluß der Promotion am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt/Main. Das Thema lautete: Entwicklung einer Drei-Komponenten-Stopped flow-Apparatur und kinetische Studien zur Komplexbildung des Membrancarriers Calcimycin mit Ca^{++} und Mg^{++}.

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353